Flavonoidni profil i biološka aktivnost vodenih ekstrakata samoniklih šafrana (Crocus L.) Hrvatske

Stipaničev, Mirta

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:955951

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2017.

Mirta Stipaničev
738/N

FLAVONOIDNI PROFIL I BIOLOŠKA AKTIVNOST VODENIH EKSTRAKATA SAMONIKLIH ŠAFRANA (*Crocus* L.) HRVATSKE

Rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Ksenije Durgo i Laboratoriju za fitokemiju na Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod voditeljstvom doc. dr. sc. Ivane Šole te uz pomoć asistentice Ane Huđak, mag. ing. biotech. s Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Veliko hvala docentici Ivani Šoli uz čiju sam izuzetnu pomoć stekla vrijedno iskustvo rada na znanstvenom istraživanju i čija me predanost radu i znanosti motivira da i sama budem što bolja u svom budućem poslu. Zahvaljujem se i profesorici Kseniji Durgo na svoj pruženoj pomoći i podršci tijekom izrade ovog diplomskog rada. Hvala i asistentici Ani Huđak na pomoći i savjetima pri izvođenju eksperimenata.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

FLAVONOIDNI PROFIL I BIOLOŠKA AKTIVNOST VODENIH EKSTRAKATA SAMONIKLIH ŠAFRANA (*Crocus* L.) HRVATSKE

Mirta Stipaničev, 738/N

Sažetak: Kultivirani šafran *Crocus sativus* L. od čijih se tučaka dobiva skupocjeni začin poznat je i po brojnim pozitivnim učincima na zdravlje. Međutim, postoje i druge nedovoljno istražene samonikle svojte roda *Crocus* L. koje su rasprostranjene uzduž Hrvatske, a sadrže bioaktivne tvari i mogle bi blagotvorno djelovati na zdravlje. Cilj ovog rada je analizirati flavonoidni sastav vodenih ekstrakata biljnih dijelova nekih samoniklih svojti roda *Crocus* L. te istražiti *in vitro* biološki utjecaj ekstrakata latica na CaCo-2 staničnoj liniji. U svrhu analize flavonoidnog sastava korištena je metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, a biološki učinak je utvrđen mjerenjem citotoksičnosti i indukcije reaktivnih kisikovih radikala. Dijelovi cvijeta (prašnici, tučci, latice) imaju visok sadržaj glikozida kempferola i kvercetina, ali sastav i količina značajno variraju ovisno o svojti i dijelu cvijeta. Ekstrakti latica nisu pokazali citotoksično djelovanje pri analiziranim koncentracijama, pritom su neki od njih značajno snizili indukciju radikala. Flavonoidnim sastavom i biološkim djelovanjem istaknula se ljubičasta forma svojte *C. vernus* ssp. *vernus*.

Ključne riječi: *citotoksičnost, Crocus L., flavonoidi, HPLC, reaktivne kisikove vrste*

Rad sadrži: 55 stranica, 22 slike, 2 tablice, 71 literaturni navod

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *prof. dr. sc. Ksenija Durgo*

Pomoć pri izradi: *doc. dr. sc Ivana Šola, Ana Huđek, mag. ing. biotech.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:
1. Prof. dr. sc. Draženka Komes
2. Prof. dr. sc. Ksenija Durgo
3. Doc. dr. sc. Ivana Šola
4. Prof. dr. sc. Vesna Bačun-Družina (zamjena)

Datum obrane: 21. srpnja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

FLAVONOID PROFILE AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF CROATIAN WILD SAFFRON SPECIES (*Crocus* L.) WATER EXTRACTS

Mirta Stipaničev, 738/N

Abstract: Cultivated saffron (*Crocus sativus* L.) from whose stigmas expensive spice saffron is made, is also known for its many benefical health effects. However, there are other scarcely researched wild *Crocus* L. taxa that grow in Croatia, contain bioactive compounds and could have positive effects on health. The aim of this thesis was to analyze flavonoid composition in water extracts of some wild *Crocus* L. species taxa and to investigate the biological activity of petal extracts on CaCo-2 cell line. To analyze the flavonoid profile, high performance liquid chromatography was used and biological activity was determined by measuring cytotoxicity and induction of reactive oxygen species. Flower parts (stamens, stigmas, petals) are rich in kaempferol and quercetin glycosides, but the composition and the quantitiy of these compounds vary depending on the specie and the flower part. Petal extracts haven't shown cytotoxic activity in analyzed concentrations though some of the extracts decreased the induction of radicals. Considering its flavonoid composition and *in vitro* biological acitivity, purple form of *C. vernus ssp. vernus* is shown to be the most prominent among sampled taxa.

Keywords: *cytotoxicity, Crocus L., flavonoids, HPLC, reactive oxygen species*

Thesis contains: 55 pages, 22 figures, 2 tables, 71 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format**) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology**,** Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD. Ksenija Durgo, Full professor

Technical support and assistance: PhD. Ivana Šola, Assistant professor, Ana Huđak, mag. ing. biotech.

Reviewers:
1. PhD. *Draženka Komes,* Full professor
2. PhD. *Ksenija Durgo,* Full professor
3. PhD. *Ivana Šola,* Assistant professor
4. PhD. *Višnja Bačun-Družina,* Full professor (substitute)

Thesis defended: 21st July 2017

Sadržaj **stranica**

1.UVOD ... 1
2. TEORIJSKI DIO ... 3
2.1. ŠAFRANI (*CROCUS* L.) ... 3
2.1.1. Samonikli šafrani hrvatske flore ... 4
2.1.2. Kultivirani šafran (*Crocus sativus* L.) ... 5
2.1.3. Zdravstveni aspekti ... 6
2.2. FLAVONOIDI I NJIHOVI GLIKOZIDI ... 8
2.2.1. Kvercetin i izoramnetin ... 9
2.2.2. Kempferol ... 11
2.3. PREHRAMBENI ZNAČAJ ŠAFRANA ... 13
2.3.1. Nutritivni sastav ... 14
2.3.2. Funkcionalna hrana ... 15
3. EKSPERIMENTALNI DIO ... 16
3.1. MATERIJAL ... 16
3.1.1. Biljna tkiva ... 16
3.1.2. Kemikalije i reagensi ... 17
3.1.3. Instrumenti i pribor ... 18
3.2. METODE RADA ... 19
3.2.1. Optimizacija ekstrakcije ... 19
3.2.1.1. Vrsta i temperatura otapala ... 19
3.2.1.2. Vrijeme ekstrakcije i upotreba ultrazvučne kupelji ... 19
3.2.2. Priprema ekstrakata ... 20
3.2.3. Određivanje flavonoida metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (RP-HPLC) ... 20
3.2.3.1. Analiza aglikona flavonoida ... 21
3.2.3.2. Analiza glikozida flavonoida ... 21
3.2.4. Ispitivanje učinka ekstrakta latica samoniklih šafrana na stanice raka CaCo-2 ... 22
3.2.4.1. Uzgoj stanica i priprema stanične suspenzije ... 22
3.2.4.2. Određivanje citotoksičnosti (*Neutral Red* metoda) ... 22
3.2.4.3. Određivanje indukcije reaktivnih kisikovih vrsta (DCFH-DA metoda) ... 23
3.2.5. Statistička obrada podataka ... 24
4. REZULTATI I RASPRAVA ... 25
4.1. OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE ... 25
4.1.1. Vrsta i temperatura otapala ... 25
4.1.2. Vrijeme ekstrakcije i upotreba ultrazvučne kupelji ... 27
4.2. IDENTIFIKACIJA I KVANTIFIKACIJA GLIKOZIDA I AGLIKONA FLAVONOIDA METODOM TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC) ... 28
4.2.1. Analiza aglikona flavonoida ... 29
4.2.2. Analiza glikozida flavonoida ... 36

4.3. ISPITIVANJE BIOLOŠKOG UČINKA EKSTRAKTA LATICA SAMONIKLIH ŠAFRANA NA STANICAMA RAKA CaCo-2 40
4.3.1. Citotoksičnost 41
4.3.2. Indukcija reaktivnih kisikovih vrsta 43
4.3.3. Povezanost citotoksičnosti, indukcije reaktivnih kisikovih vrsta i koncentracije identificiranih glikozida i aglikona 46
5. ZAKLJUČCI 48
6. LITERATURA 49

1.UVOD

Rod *Crocus* L., odnosno šafrani, čini više od 160 vrsta rasprostranjenih diljem svijeta, a najraširenij su na Balkanskom poluotoku i Maloj Aziji (Moratalla-López i sur., 2016). Među svim vrstama roda *Crocus* L., najpoznatija je *Crocus sativus* L. od čijih se tučaka dobiva skupocjeni začin. Sam naziv šafran potječe od arapskog „za´-faran" što u prijevodu znači „biti žut", čime asocira na intenzivnu boju tog začina. U posljednjih dvadesetak godina, ova je vrsta zbog svojih potencijalnih terapeutskih svojstava postala vrlo popularna te su mnoga istraživanja provedena u svrhu analize aktivnih komponenti i njihovog učinka na zdravlje čovjeka. Samo neki od pokazanih farmakoloških učinaka tučaka šafrana i njegovih izoliranih spojeva su: protuupalni, antioksidativni, antidijabetički, antidepresivni, antikonvulzivni i antikancerogeni te pozitivan učinak na pamćenje, imunitet, kardiovaskularni, respiratorni i gastrointestinalni sustav (Al-Snafi, 2016). Uzgoj i sakupljanje ove vrste je vremenski vrlo zahtjevan proces jer je još uvijek jedina metoda ručno branje i odvajanje tučaka. Jedan cvijet ima samo 3 tučka od kojih svaki teži oko 2 mg pa je za dobivanje 1 kg začina potrebno ubrati oko 150 000 cvjetova (Winterhalter i Straubinger, 2000). Proizvodnja ovog začina rezultira stvaranjem velike količine biološkog otpada jer tučci čine samo oko 7% mase cijelog cvijeta, a ostali dijelovi, odnosno latice i prašnici, koji čine 93% ukupne mase se ne koriste (Serrano-Díaz i sur., 2013). Upravo zbog toga, sve je više istraživanja usmjereno na bio-otpad proizvodnje začina šafrana, posebice latice, koje su se pokazale kao odličan izvor bioaktivnih spojeva, flavonoida i antocijana (Zeka i Arro, 2016).

Flavonoidi su polifenolni spojevi najčešće prisutni u obliku glikozida. Uz njih se vežu brojna biološka djelovanja, a konzumacija flavonoida iz prirodnih izvora kao što su hrana i piće pozitivno utječe na zdravlje (Cazarolli i sur., 2008).

U Hrvatskoj raste 10 samoniklih svojti roda *Crocus* L. Iako su veoma rasprostranjene i česte samonikle proljetnice, vrlo je malo provedenih istraživanja o njihovom sastavu, biološkom učinku te mogućoj primjeni u prehrani, a mogle bi biti bogate bioaktivnim tvarima i pokazivati pozitivne učinke na zdravlje kao i vrsta *C. sativus* L. te se koristiti u razvoju novih funkcionalnih proizvoda u prehrambenoj industriji.

Svrha ovog rada je istražiti sadržaj flavonoida i biološki učinak vodenih ekstrakata odabranih samoniklih svojti roda *Crocus* L. (*C. malyi* Vis., *C. reticulatus* Steven ex Adams, *C. vernus* (L.) Hill. ssp. *albiflorus* (Kit.) Asch. et Graebn. i *C. vernus* (L.) ssp. *vernus* ljubičaste i bijele forme)

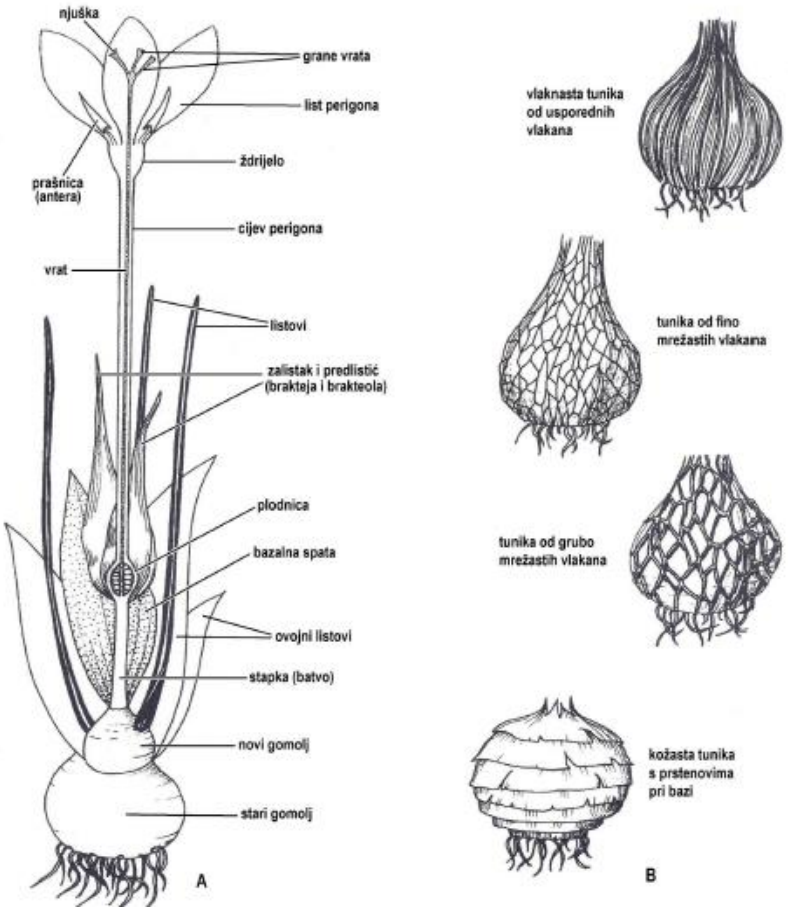
te ih teorijski usporediti s kultiviranom vrstom *Crocus sativus* L. i razmotriti njihovu potencijalnu primjenu u prehrambenoj industriji.

Nakon provedene ekstrakcije, za određivanje sastava flavonoida, koristit će se metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. *high performance liquid chromatography*, HPLC). Utvrđivanje biološkog učinka vodenih ekstrakata latica šafrana ispitivat će se na stanicama raka debelog crijeva (CaCo-2). U tu svrhu bit će korišten test citotoksičnosti (*Neutral red* metoda) i test indukcije reaktivnih kisikovih vrsta (DCFH-DA metoda).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ŠAFRANI (*CROCUS* L.)

Rod *Crocus* L. spada u porodicu *Iridaceae* (perunike), višegodišnje cvjetajuće biljke u koje se svrstava više od 70 rodova i 1700 vrsta. Sam rod tvori oko 160 vrsta koje su rasprostranjene od centralne i južne Europe, sjeverne Afrike i Bliskog Istoka pa do centralne Azije i zapadnog dijela Kine, a središte bioraznolikosti roda je područje Balkanskog poluotoka i Turske. Jedna od karakteristika vrsta roda *Crocus* L. (Slika 1) je da posjeduju lukovicu, spremišni dio hranjivih tvari, koji im omogućava preživljavanje tijekom suhih razdoblja. Lukovice vrlo variraju u veličini i obliku ovisno o vrsti. Skoro sve vrste imaju karakterističnu bijelu crtu po dužini sredine lista koja nastaje kao posljedica nedostatka klorofila u određenim stanicama. Cvjetove čini šest latica u dva sloja po tri, a boje latica mogu biti bijele, ljubičaste i žute u različitim kombinacijama i nijansama ovisno o vrsti. Unutar cvijeta nalaze se tri prašnika (Koulakiotis, 2015).



Slika 1. Morfološke osobine roda *Crocus* L. (A- dijelovi biljke, B - vrste lukovice) (Milović, 2016)

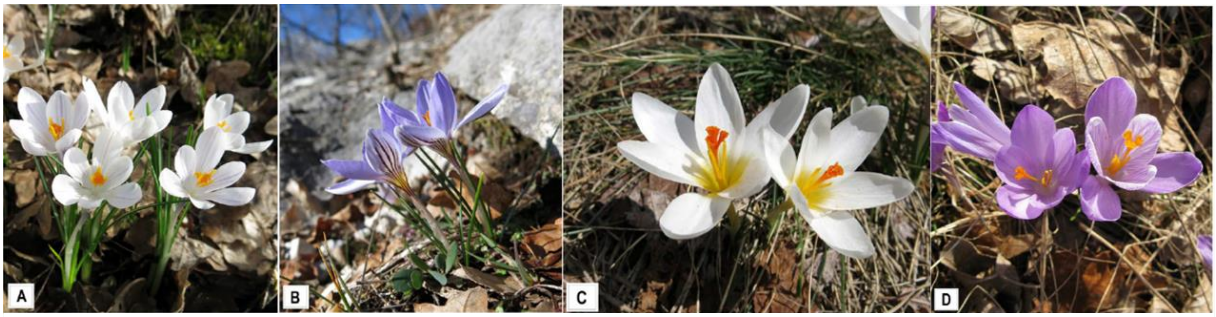
Određivanje vrsta roda *Crocus* L. je iznimno zahtjevno zbog velikih morfoloških varijacija među vrstama te čak i među jedinkama iste populacije (Milović, 2016).

2.1.1. Samonikli šafrani hrvatske flore

U Hrvatskoj raste 11 svojti šafrana, od toga 10 svojti je samoniklo, a vrsta *C. sativus* L. je kultivirana. Samonikle vrste su: *C. biflorus* Mill. ssp. *weldenii* (Hoppe & Fürnr.), *C. dalmaticus* Vis., *C. malyi* Vis., *C. pallasii* Goldb., *C. reticulatus* Steven ex Adams, *C. thomasii* Ten., *C. tommasinianus* Herb. i *C. vernus* (L.) Hill., odnosno dvije podvrste - ssp. *albiflorus* (Kit.) Asch. et Graebn. i - ssp. *vernus* (sinonimi *C. purpureus* Weston i *C. neapolitanus*). *C. biflorus* Mill. ssp. *weldenii* (Istra, Kvarner i Dalmacija) *C. dalmaticus* (centralna i južna Dalmacija), *C. malyi* (Velebit) i *C. thomasii* (Dalmacija) spadaju u endemske vrste hrvatske flore te sve rastu u mediteranskom području (Mitić i sur., 2014).

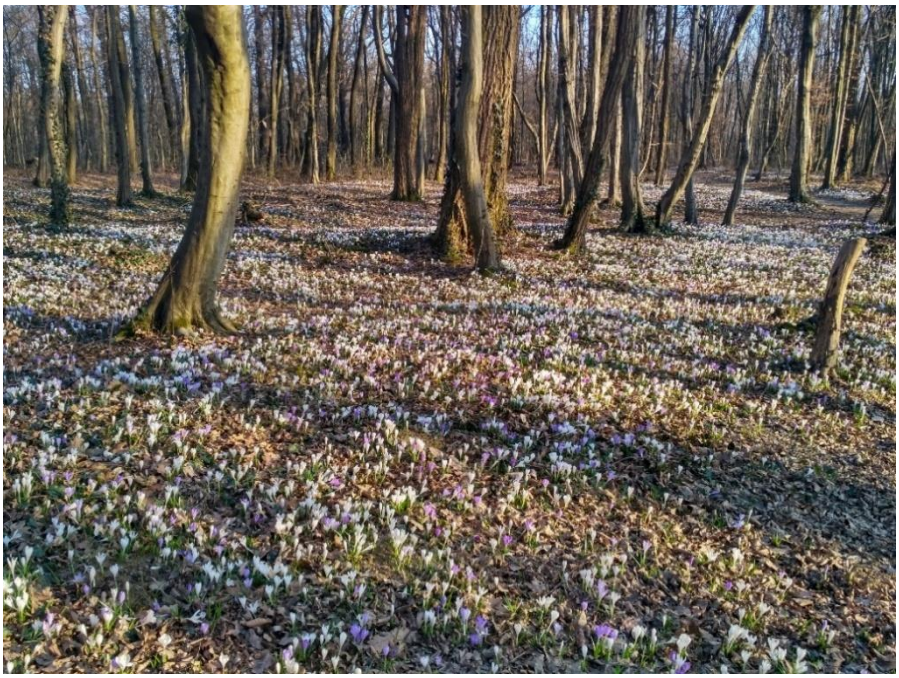
Milović (2016) je proveo reviziju *Crocus* vrsta prisutnih u Hrvatskoj te je predložio izmjene: brisanje vrste *C. pallasii* Goldb., dodavanje samostalne svojte *C. heuffelianus* Herb koja je dosada bila sinonim za vrstu *C. vernus* (L.) Hill. ssp. *vernus* te izmjenu naziva vrste *C. reticulatus* Steven ex Adams u *C. variegatus* Hoppe et Hornsch.

Na slici 2 prikazane su 4 samonikle svojte, a slika 3 prikazuje vrstu *C. vernus* ssp. *vernus* u cvatu u proljeće.



Slika 2. Samonikli šafrani

A - *C. vernus* ssp. *albiflorus*, B - *C. reticulatus*, C - *C. malyi*, D - *C. vernus* ssp. *vernus* (Milović, 2016)



Slika 3. Polje samoniklih šafrana u proljeće (park Maksimir, Zagreb)

Većina istraživanja hrvatskih vrsta roda *Crocus* L. provedena je iz područja botanike, u svrhu analize morfoloških obilježja, fenotipskih karakteritika, taksonomije i rasprostranjenosti te je malo poznato o samom kemijskom sastavu tih vrsta (Milović, 2016).

2.1.2. Kultivirani šafran (*Crocus sativus* L.)

C. sativus L. je jedina kultivirana *Crocus* vrsta koja se uzgaja zbog dobivanja skupocjenog začina šafrana. Začin se dobiva sušenjem tučaka, preciznije njuški tučaka (lat. *stigmae*). Ova vrsta cvjeta u jesen te se razmnožava vegetativno jer su cvjetovi sterilni, odnosno ne daju plodno sjeme. Povijest upotrebe šafrana u medicini i prehrani je duga i vjeruje se da seže još od vremena Mezopotamije, a pronađen je na nekoliko starogrčkih freski nastalih 1600-1700 godina pr.Kr. Danas se njegov uzgoj proširio na cijeli svijet dok Iran prednjači po uzgoju i proizvodnji. Najveći problem kod proizvodnje ovog začina, zbog kojeg i ima tako visoku cijenu, je vrijeme i način sakupljanja tučaka. Naime, oko 150 000 cvjetova se treba ručno ubrati i odvojiti tučke da bi se proizveo jedan kilogram gotovog začina. Cijena jednog grama doseže i do 50 američkih dolara čime je šafran ne samo najskuplji začin na svijetu, nego ga to i svrstava među najskuplje materijale svijeta. Ono što šafran čini posebnim u kulinarstvu je njegova karakteristična aroma i intenzivna narančasta boja kojima obogaćuje izgled i okus jela, međutim istraživanja pokazuju da posjeduje i pozitivne učinke na zdravlje te ima potencijal primjene u medicini (Winterhalter i Straubinger, 2007, Melnyk i sur., 2010).

Velik broj studija bavio se analizom sastava začina šafrana i identifikacijom njegovih aktivnih komponenti. Šafran je bogat antioksidansima, a četiri glavne aktivne tvari su krokin, kroketin, pikrokrokin i šafranal koje također sudjeluju i u organoleptičkim svojstvima šafrana. Krokini, od kojih najviše ima α-krokina, pripadaju hidrofilnim karotenoidima te daju šafranu intenzivnu narančasto-žutu boju. Kroketin je također karotenoid, prekurskor u sintezi krokina. Krokini su prisutni u glikoziliranom obliku što ih čini dobro topljivim u vodi. Pikrokrokin je zaslužan za blago gorkast okus šafrana te je druga najzastupljenija komponenta šafrana (1 – 13% ukupne suhe tvari). Prirodnom deglikozilacijom pikrokrokina nastaje šafranal, komponenta zaslužna prvenstveno za aromu (Melnyk i sur., 2010).

Usprkos brojnim pozitivnim učincima na zdravlje i dalje postoji problem uzgoja i proizvodnje šafrana pa bi i njegova primjena u medicini ili u funkcionalnoj hrani bila jednako skupa kao i u prehrani. Zbog toga bi se fokus trebao prebaciti na istraživanja bio-otpada proizvodnje šafrana. Bio-otpad predstavlja veliki problem jer tučci od kojih se proizvodi začin čine samo oko 7% mase cvijeta šafrana (Serrano-Díaz i sur., 2013). U posljednjih desetak godina raste broj studija koje se bave tim problemom, odnosno analizom sastava te učincima na zdravlje bio-otpada, posebice latica.

Latice imaju visok sadržaj antioksidansa i bioaktivnih tvari. Identificirani su glikozidi flavonoida, od kojih su najbrojniji glikozidi kempferola (70-80%) i kvercetina (5-10%), a ostalo čine glikozidi izoramnetina, dihidrokempferola, mircetina i apigenina (Nørbæk i sur., 2002). Također su identificirani i glikozidi antocijanina: delfinidina, petunidina i cijanidina (Barreira i sur., 2014). Od drugih aktivnih tvari nađeni su krokin i kroketin, ali u znatno manjoj količini nego u tučcima (Zeka i sur., 2015).

2.1.3. Zdravstveni aspekti

Antioksidativno, protuupalno, antinociceptivno i antidepresivno samo su neka od pokazanih zdravstvenih učinaka ekstrakata latica kultiviranog šafrana (Righi i sur., 2015). Visoka antioksidativna aktivnost utvrđena je DPPH metodom, gdje su metanolni ekstrakti latica pokazali slično antioksidativno djelovanje kao i sintetički antioksidans koji se često upotrebljava u prehrambenoj industriji, TBHQ (tert-butilhidrokinon) (Goli i sur., 2012). Još jedna studija o antioksidativoj aktivnosti latica šafrana je pokazala da iako su različiti ekstrakti latica imali slabiju aktivnost od standarda kvercetina i askorbinske kiseline, latice su imale veću antioksidativnu aktivnost od svih testiranih ekstrakata tučaka šafrana (Termentzi i Kokkalou, 2008).

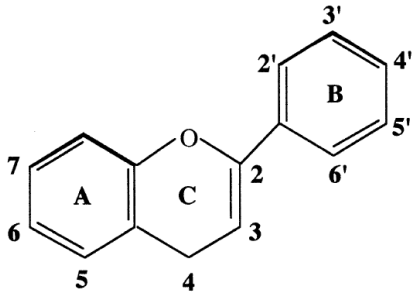
Hidrolizirani ekstrakti latica šafrana pokazali su snažno antimikrobno djelovanje na patogene sojeve bakterija *Listeria monocytogenes* i *Salmonella enterica* u minimalnoj količini od 1,5 mg ekstrakta. To djelovanje je povezano s identificiranim aglikonima kempferola i kvercetina u hidroliziranim ekstraktima koji se bolje transportiraju kroz mikrobne stanične membrane od pripadajućih glikozida (Kakouri i sur., 2017). Inkapsulirani ekstrakti latica šafrana pokazali su terapeutski učinak na blagi do umjereni oblik depresije. Pacijenti su uzimali 15 g sušenog ekstrakta latica dva puta dnevno kroz 6 tjedana. Druga skupina pacijenata je uzimala istu količinu sušenog ekstrakta tučaka šafrana. Rezultati su pokazali da je ekstrakt latica imao jednako dobar učinak kao i tučci. Tučci su pokazali antidepresivni učinak u već nekoliko studija do sad pa ovo istraživanje daje veliki značaj laticama šafrana koje bi se također mogle koristiti kao pomoć pri depresiji, a znatno su jeftinije od tučaka (Akhondzadeh Basti i sur., 2008). U studiji na miševima uočen je i pozitivan učinak vodenog ekstrakta latica šafrana na hipertenziju, aterosklerozu i inzulin rezistenciju (Shahi i sur., 2016).

Prema najnovijim istraživanjima, cvjetovi šafrana posjeduju i potencijal primjene u kozmetičkoj industriji. Verjee i suradnici su istraživali učinak acetonskog ekstrakta cvjetova šafrana (bez tučaka) na stanice keratinocita, odnosno na njihovu migraciju i proliferaciju. Rezultati su pokazali da navedeni ekstrakt može pospješiti zacijeljivanje rana što je rezultat sinergije bioaktivnih komponenti prisutnih u cvjetovima (Verjee i sur., 2017).

Od ostalih vrsta roda *Crocus* L., *C. biflorus, C. baytopiorum* i *C. flavus ssp. dissectus,* samonikle vrste turske flore, su pokazale dobro antioksidativno i antimikrobno djelovanje na patogene bakterije. Najbolje djelovanje su imali metanolni i etil-acetatni ekstrakti navedenih vrsta (Acar i sur., 2010). Metanolni ekstrakti tučaka endemskih vrsta grčke flore, *C. boryi ssp. tournefortii, C. boryi ssp. boryi i C. niveus*, su djelovali antiproliferativno na stanice raka dojke. Zanimljivo, antiproliferativno djelovanje tri navedene vrste je bilo snažnije od ekstrakta kultiviranog šafrana. Učinak se može pripisati visokoj koncentraciji krokina u ekstraktima (20% suhe mase tučaka), međutim sam mehanizam djelovanja je nepoznat (Chryssanthi i sur., 2007).

2.2. FLAVONOIDI I NJIHOVI GLIKOZIDI

Flavonoidi čine veliku skupinu polifenolnih spojeva koji su prisutni u svim biljnim vrstama. Pripadaju sekundarnim metabolitima te ih biljke sintetiziraju u svrhu zaštite od vanjskih utjecaja. Po kemijskoj strukturi pripadaju niskomolekularnim hidroksiliranim fenolnim spojevima. Osnovnu strukturu molekule čine tri prstena A, B i C. Benzenski prsten A je kondenziran sa šesteročlanim prstenom C koji na drugom atomu ugljika ima fenil benzenski prsten B kao supstituent. Ako je C prsten heterociklički γ-piran onda se radi o flavanolima i antocijanidinima, a ako je γ-piron onda spoj po strukturi pripada flavonolima, flavononima ili flavanonima (Slika 4). Velika strukturna raznolikost flavonoida rezultira i različitom kemijskom prirodom koja ovisi o stupnju hidroksilacije, konjugacije i polimerizacije te prisutstvu supstituenata. Flavonoidi u biljkama su relativno otporni na povišenu temperaturu i kisik, ali mogu biti modificirani sunčevom svjetlošću. Fotostabilnost flavonoida ovisi o prirodi hidroksilne grupe vezane na treći ugljikov atom C prstena. Također, odsutstvo glikozilacije na istom položaju rezultira boljom fotostabilnošću molekule (Aherne i O'Brien, 2002).



Slika 4. Osnovna struktura flavonoida
(Aherne i O'Brien, 2002)

Većina flavonoida u biljkama je prisutna u obliku glikozida, a nešto manji dio u obliku aglikona i metiliranih derivata. Aglikon flavonoida je naziv za slobodnu molekulu flavonoida, dok naziv glikozid flavonoida označava aglikon koji ima vezanu molekulu saharida. Glikozidna veza najčešće se javlja na trećem ili sedmom ugljikovom atomu kod *O*-glikozida (hemiacetalna veza), a kod *C*-glikozida (ugljik-ugljik veza) na šestom i osmom ugljikovom atomu. Vezana molekula je većinom D-glukoza i L-ramnoza te rijeđe glukoramnoza, galaktoza, arabinoza ili kombinacije u obliku di- i trisaharida. Veliki broj i raznolikost glikozida u prirodi je rezultat upravo mnogih kombinacija i veza koje mogu nastati između aglikona i saharida (Cazarolli i sur., 2008., Kumar i Padney, 2013).

Apsorpcija i biodostupnost flavonoida je i dalje predmet znanstvenih rasprava, konkretno u kojoj mjeri se apsorbiraju glikozidi, a u kojoj aglikoni i koji biokemijski procesi u tome sudjeluju. Glikozidna veza glikozida flavonoida je otporna na enzime gušterače pa glikozidi dospjevaju u tanko crijevo nerazgrađeni. Na primjeru kvercetina je ustanovljeno da *β*-glukozidaze u tankom crijevu sudjeluju u hidrolizi glikozida, oslobađajući aglikone. Aglikoni su hidrofobni pa mogu proći kroz membrane stanica pasivnim transportom. Međutim jedno istraživanje je pokazalo da je glikozidni oblik kvercetina bolje apsorbiran od aglikona pa se postavlja teorija da i glikozidi mogu ući u stanice crijeva aktivnim transportom te da u tome sudjeluje natrij-glukoza transporter u tankom crijevu. Nakon apsorpcije, flavonoidi se prenose do jetre gdje se mogu odvijati daljnje reakcije metilacije, hidroksilacije i redukcije. Biotransformacija flavonoida odvija se putem konjugacije s glukuronskom kiselinom ili sa sulfatom. Iz organizma se izlučuju putem urina ili žuči. Intestinalna mikroflora također igra ulogu u metabolizmu flavonoida. Oni glikozidi koji se nisu apsorbirali u tankom crijevu mogu biti hidrolizirani u aglikone djelovanjem bakterijskih enzima intestinalne mikorfolore (Aherne i O'Brien, 2002).

Antioksidativna aktivnost flavonoida također ovisi radi li se o aglikonskom obliku ili glikozidu, ali i u tom području je potrebno još istraživanja. Aglikon kvercetina je pokazao jače antioksidativno djelovanje od svojih glikozida, izokvercetina i rutina izoliranih iz Rooibos čaja. Pokazano je da glikozidi s glikozidnom vezom na trećem ugljikovom atomu, pod uvjetom da se radi o monosaharidu, imaju sličnu aktivnost kao i pripadajući aglikoni. Kada je glikozidni dio disaharid, antioksidativna aktivnost opada (von Gadow i sur., 1997).

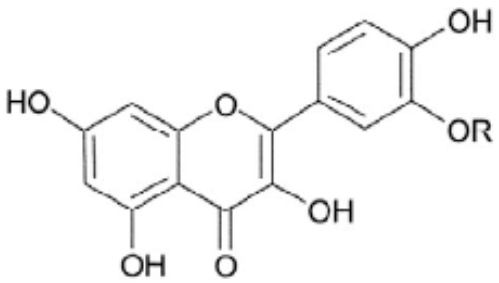
2.2.1. Kvercetin i izoramnetin

Kvercetin po svojoj kemijskoj strukturi pripada flavonolima. Flavonoli su podskupina flavonoida čiji kostur molekule čini 3-hidroksi-flavon. Kvercetin je vrlo raširen spoj u biljnom svijetu, a među glavnim prehrambenim izvorima su grožđe, jagode, jabuke, luk, paprike te vino i čaj. U zapadnoj populaciji prosječna količina ovog flavonola unešena hranom u jednom danu iznosi 10 mg. Nadalje, na tržištu nekih zemalja se nude brojni dodaci prehrani s kvercetinom u dnevnim dozama od 200-1200 mg i funkcionalna hrana u kojoj se može dodavati u količini od 10-125 mg po serviranju (D'Andrea, 2015). U biljkama je najčešće prisutan u oblizu kvercetin-3-*O*-rutinozida (rutin), a među ostalim glikozidnim oblicima kvercetina ističu se glukozidi, galaktozidi i arabinozidi (Erlund, 2004).

Kvercetin je vrlo efikasan antioksidans i hvatač slobodnih radikala, čak i visoko reaktivnih poput peroksinitrita i hidroksil radikala, ali nekoliko studija je otkrilo i njegovo prooksidativno djelovanje u *in vitro* uvjetima. Njegov oksidirani oblik, kvercetin-kvinon može biti vrlo reaktivan s tiolima i formirati adukte s glutationom te je vjerojatno i povezan s mutagenim učincima koje je kvercetin uzrokovao u jednoj *in vitro* studiji na bakterijima (D'Andrea, 2015). Ipak, puno je više dokumentiranih pozitivnih učinaka kvercetina kao hepatoprotektivni, antidijabetički, protuupalni i antibakterijski učinak. Postoji i potencijal njegove primjene kao terapije kod gubitka suvišne tjelesne mase (Nabavi i sur., 2015). *In vivo* studije su pokazale antioksidativno i protuupalno djelovanje kvercetina koje je izraženije što su veći oksidativni stres i jači upalni procesi. Time bi kvercetin mogao biti od velike pomoći kod bolesti u kojima su ta dva parametra povišena, kao primjerice kod hipertenzije (Boots i sur., 2008).

Na apsorpciju kvercetina u organizmu utječe glikozidni oblik u kojem se nalazi te prisutstvo drugih molekula (etanol, lipidi, emulgatori). Prva istraživanja o biodostupnosti su pokazala vrlo slabu apsorpciju, oko 2%, a najviša ikad izmjerena biodostupnost iznosila je 44% kada je aglikon kvercetina bio otopljen u etanolu. U normalnim uvjetima koncentracija kvercetina u plazmi je niska, ali kontinuiranom suplementacijom bi se značajno mogla povećati. Taj zaključak proizlazi iz istraživanja na svinjama i štakorima gdje je pokazano da je poluživot metabolita kvercetina relativno visok, 11 do 28 sati (Boots i sur., 2008).

Izoramnetin (3-*O*-metil-kvercetin) je metilirani oblik kvercetina (slika 5) i nastaje tijekom metabolizma kvercetina u tijelu. Pronađen je u plazmi, urinu i žuči miševa kojima su u hranu dodane velike količine kvercetina i u *in vitro* metabolizmu stanica raka jetre (Erlund, 2004). Izoramnetin je također i prirodno prisutan flavonoid, u biljkama se često pojavljuje u kombinaciji s kvercetinom te i on posjeduje korisna biološka svojstva. Neki od izvora izoramnetina su jabuke, grožđe i ljekovito bilje kao *Ginkgo biloba* (ginko) i *Hippophae rhamnoides* (pasji trn). Potencijalno bi mogao štititi organizam protiv raka, kardiovaskularnih bolesti te Alzheimerove bolesti, što se sve pripisuje njegovim odličnim antioksidativnim svojstvima (Duan i sur., 2014). Ipak, u jednom istraživanju kvercetin je pokazao jače antioksidativno djelovanje u neutralizaciji ABTS radikala od izoramnetina pri jednakoj koncentraciji (Zuo i sur., 2011). Glikozidi izoramnetina izolirani iz vrste *Opuntia ficus-indica* (indijska smokva) djelovali su protuupalno u *in vivo* studiji na štakorima. Izoramnetin-3-*O*-glukozil-ramnozil ramnozid je imao bolje djelovanje od izoramnetin-3-*O*-glukozil ramnozida što upućuje na to da glikozidni profil utječe na protuupalni učinak flavonoida (Antunes-Ricardo i sur., 2015).

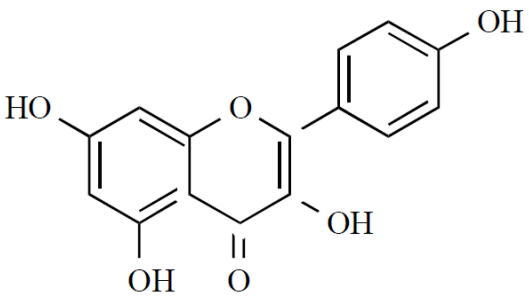


Slika 5. Kemijska struktura kvercetina (R=H) i izoramnetina R= (CH_3) (Kiumarsi i sur., 2017)

2.2.2. Kempferol

Kempferol je uz kvercetin jedan od najistraživanjih flavonola i flavonoida općenito s više od dvije tisuće objavljenih radova o njegovoj izolaciji ili biološkim svojstvima. Kemijska struktura kempferola prikazana je na slici 6. Enzimi potrebni za njegovu biosintezu su vrlo česti u biljakama što objašnjava njegovu raširenost i prisutnost u mnogim biljnim vrstama. Kao i ostali flavonoidi, najčešće se nalazi u obliku glikozida u kojem saharidni dio čine glukoza, ramnoza, galaktoza i/ili rutinoza. Kempferol-3-*O*-glukozid (astragalin) je jedan od najraširenijih glikozida. Istraživanja su potvrdila prisutstvo kempferola i njegovih glikozida u više od 400 biljnih vrsta te je procijenjeno da čovjek dnevno unese oko 10 mg ovog spoja kroz hranu i piće. Neki od bogatih izvora kempferola su čaj, brokula, kupus, kelj, grah, poriluk, jagode, grožđe te ljekovite biljke kao *Ginkgo biloba* (ginko), *Tilia* spp. (lipa), *Equisetum* spp. (preslica), *Moringa oleifera* (konjska rotkvica) *i Sophora japonica* (japanska sofora) (Calderón-Montaño i sur., 2011).

Mnogi pozitivni zdravstveni učinci se pripisuju kempferolu i njegovim glikozidima, antikancerogeno, antioksidativno, protuupalno, antimikrobno, neuro- i kardioprotektivno samo su neki od njih (Calderón-Montaño i sur., 2011).



Slika 6. Kemijska struktura kempferola (Calderón-Montaño i sur., 2011)

Provedene su brojne epidemiološke studije o povezanosti konzumacije hrane bogate kempferolom i učestalosti pojave određenih bolesti. Učestala konzumacija hrane bogate kempferolom rezultirala je smanjenim rizikom od nastanka raka pluća u pušača, raka želuca, raka jajnika i raka gušterače te smanjenim rizikom od kardiovaskularnih bolesti. Međutim hrana je bogata i drugim fitokemikalijama, vitaminima i mineralima koji mogu djelovati sinergistički i imati utjecaj na razvoj bolesti pa se ne može zaključiti da je kempferol isključivo odgovoran za smanjeni rizik od navedenih bolesti (Calderón-Montaño i sur., 2011).

In vitro studije su pokazale citotoksično i apoptotičko djelovanje kempferola na glioblastom, adenokarcinom dojke, leukemiju, rak pluća, debelog crijeva, prostate, gušterače i rak usne šupljine. Kempferol nije imao učinka na nekancerozne stanice što upućuje na to da je visoko selektivan za stanice raka. Posjeduje potencijal primjene kao lijeka protiv raka te ima i manju toksičnost nego drugi lijekovi korišteni u kemoterapiji (Gutiérrez-del-Río i sur., 2016).

Slaba biodostupnost i apsorpcija predstavljaju prepreke kod korištenja kempferola. Mjerenjem koncentracije u plazmi nakon konzumacije točno određenih količina kempferola došlo se do zaključka da je slabo apsorbiran. U jednom istraživanju ispitanici su nakon konzumacije 9 mg kempferola iz hrane imali maksimum koncentracije u plazmi od 150 nM (DuPont i sur., 2004), a za inhibicijsko djelovanje na proliferaciju tumorskih stanica, prema *in vitro* istraživanjima, najmanja djelotvorna koncentracija kempferola je 5 μM (Berger i sur., 2013). Stoga za potencijalno antikancerogeno djelovanje potrebne su više koncentracije kempferola nego što ga ima u hrani, ali pazeći na moguću toksičnost. Međutim kao preventivno djelovanje protiv nastanka raka, prehrambeni izvori bogati kempferolom pokazuju obećavajuće rezultate (Gutiérrez-del-Río i sur., 2016).

Glikozidi kempferola i drugih flavonola predstavljaju zanimljive bioaktivne tvari koje su za razliku od samog aglikona prirodno prisutne u biljkama. To omogućava njihovo korištenje u obliku sušenog biljnog tkiva ili biljnih ekstrakata bez da je potrebno primjeniti dodatne metode u svrhu hidrolize glikozidne veze.

Kempferol-3-*O*-rutinozid (nikotiflorin) je pokazao antidijabetičko djelovanje tako što je inhibirao enzim α-glukozidazu u *in vitro* uvjetima čak i bolje od često korištenog antidijabetičkog lijeka, akarboze. Aglikoni kempferol i kvercetin imali su slabije antidijabetičko djelovanje, međutim djelovali su sinergistički u kombinaciji s ovim glikozidom te se efekt povećavao (Habtemariam, 2011). U *in vivo* studiji na miševima proučavan je hepatoprotektivni učinak nikotiflorina i kempferol-3-*O*-glukozida izoliranih iz vrte *Carthamus*

tinctorius L. (šafranika). Miševi su tretirani dozama od 200 i 400 mg kg^{-1} tjelesne mase ovih glikozida sedam dana prije tretmana ugljikovim tetrakloridom, ksenobiotikom koji uzrokuje oštećenja jetre. Miševi kojima su dani navedeni glikozidi imali su manja oštećenja jetre od kontrolne skupine, što upućuje na to da navedeni glikozidi posjeduju hepatoprotektivni učinak kod akutnog oštećenja uzrokovanog ugljikovim tetrakloridom (Wang i sur., 2015).

2.3. PREHRAMBENI ZNAČAJ ŠAFRANA

Moderan način života i promjene životnog stila doveli su do smanjene upotrebe samoniklog i divljeg bilja u svakodnevnoj prehrani ljudi. Znanje o divljim jestivim vrstama i njihovom sakupljanju prenosilo se usmenom predajom s generacije na generaciju, ali polako se gubi. Gubitak tog znanja pokušava se zaustaviti te se objavljuje sve više znanstvenih radova na temu divljih biljnih vrsta i njihove upotrebe u tradicionalnoj prehrani, naročito na području Europe (Schunko i Vogl, 2010).

Održiva prehrana sve više dobiva na popularnosti posljednjih godina, ona uz konzumaciju lokalnih samonikih vrsta uključuje i iskorištavanje cijelog jestivog dijela biljke, odnosno smanjenja proizvodnje otpada. Kada se govori o cvijeću i laticama biljaka većinom se misli o korištenju u dekorativne svrhe, a malo kao o jestivom dijelu biljke. Međutim kroz povijest cvijeće se često koristilo u prehrambene svrhe. U Kini upotreba cvijeća u kulinarstvu datira još od 3000 godina pr. Kr. Ruže, ljubičice i lavanda bile su čest sastojak starorimskih jela, a veliki cvjetovi tikvica i bundeva bili su dio svakodnevne prehrane Indijanaca. U modernom kulinarstvu također se proširila upotreba cvijeća i latica kao dekoracija i obogaćivanje okusa jela i pića. Istraživanja su pokazala da cvijeće pridonosi i nutritivnom sastavu jela te je bogat izvor bioaktivnih tvari, posebno polifenola koji pokazuju brojne pozitivne učinke na zdravlje. Time cvijeće može biti i funkcionalan dodatak hrani i pridonositi očuvanju zdravlja (Cunningham, 2015, Rop i sur., 2012).

Šafrani također spadaju u biljke korištene u tradicionalnoj prehrani nekih naroda. U austrijskoj pokrajini Štajerska cvjetovi i listovi proljetnog šafrana (*Crocus vernus* L.) korišteni su kao dodatak salatama zajedno s ostalim divljim vrstama tog kraja (Schunko i Vogl, 2010).

Konzumacija proljetnog šafrana zabilježena je također i u dijelovima Francuske i Italije, gdje se koriste lukovice, a u Srbiji upotrebljavaju se tučci kao začin u jelima. Na području Turske,

Španjolske i Jordana lukovice vrsta *C. adanensis, C. ancyrensis, C. carpentanus, C. pallasii, C. sieberi* koriste se u prehrani sirove, kuhane ili pečene (Jacobson, 2017).

Kultivirani šafran je najbolje istražena vrsta od svih šafrana ne samo po pitanju kemijskog sastava i utjecaja na zdravlje nego i u prehrambenom smislu. Najnovija istraživanja bave se analizom sastava i nutritivne vrijednosti te potencijanom primjenom bio-otpada proizvodnje začina u prehrambenoj industriji.

2.3.1. Nutritivni sastav

Prosječna masa jednog cvijeta kultiviranog šafrana iznosi 0,39 g od čega najveći dio otpada na latice (78%), zatim slijede prašnici (13,4%), njuške tučka (7,4%) te tijelo tučka (0,7%). Svježi cvjetovi sadrže više od 86% vlage, a same latice i do 90%, zbog čega ih je potrebno netom nakon branja podvrgnuti zamrzavanju ili sušenju kako bi se smanjila mogućnost kvarenja djelovanjem mikroorganizama ili kemijskih reakcija (Bell, 2007). Energetska vrijednost na 100 g suhe tvari cijelih cvjetova kultiviranog šafrana je 313 kcal, latica 312 kcal, prašnika 328 kcal, dok njuške tučaka imaju najvišu vrijednost, 381 kcal/100 g. Što se tiče nutritivnog sastava, cijeli suhi cvjetovi sadrže visok udio ukupnih proteina (10,1 mg/100 g), a od dijelova cvijeta taj je udio najviši u prašnicima (24,1 mg/100 g). Cijeli cvjetovi također sadrže i visok udio dostupnih ugljikohidrata (61,2 mg/100 g) te nizak udio lipida (3,2/100 g) (Serrano-Diaz i sur., 2013). Zanimljivo, udio proteina je veći od udjela u cvjetovima drugih vrsta opisanih u literaturi (Rop i sur., 2012).

Cvjetovi šafrana u prehrani mogu biti dobar izvor vlakana jer sadrže 14,4 g/100 g ukupnih vlakana, od čega topljiva vlakna dominiraju. Latice su još bogatiji izvor ukupnih vlakana s 27,5 g/100 g. Također, omjer topljivih i netopljivih vlakana je u intervalu (1,0 do 2,3) potrebnom da bi se postigao povoljan fiziološki efekt u tijelu koji je povezan s konzumacijom obje vrste vlakana. Konzumacija 100 g suhih cvjetova šafrana zadovoljila bi jednu trećinu potrebnog prehrambenog referentnog unosa (eng. *Dietary Reference Intake*, DRI) muške osobe u dobi od 18 do 30 godina za fosfor, magnezij te kalij, a čak duplo za željezo. Time su cvjetovi šafrana i dobar izvor minerala fosfora, magnezija, kalija i željeza (Serrano-Díaz i sur., 2013).

Ulje dobiveno ekstrakcijom iz latica šafrana je dobar izvor fitosterola, tvari koje djeluju na snižavanje kolesterola u krvi te posjeduju antikancerogena svojstva. Prema Feizy i Reyhani (2016) glavni fitosteroli latica šafrana su fukosterol (47 g/100 g), stigmasterol (32 g/ 100 g), sitosterol (10 g/100 g) i fagarasterol (9 g/100 g).

2.3.2. Funkcionalna hrana

Zbog visokog udjela prirodnih antioksidansa i ostalih bioaktivnih tvari te povoljnog nutritivnog sastava, cvjetovi šafrana postaju vrijedan dodatak u formulacijama novih funkcionalnih proizvoda. Talijanski znanstvenici formulirali su sokove od bio-otpada proizvodnje začina šafrana, odnosno cvjetova bez tučaka. Koristili su svježe ubrane cvjetove iz kojih su postupkom prešanja i filtracije 24 i 48 sati nakon branja proizveli sokove. Rezultati su pokazali da sokovi posjeduju izuzetno visoku antioksidativnu aktivnost i sadrže visok udio flavonola i antocijana. Kod sokova dobivenih iz cvjetova ubranih 48 sati prije postupka prešanja nije došlo do smanjenja antioksidativne aktivnosti u odnosu na one ubrane 24 sata prije što upućuje na dobru stabilnost te da svježi cvjetovi mogu biti skladišteni i dva dana prije ekstrakcije bez gubitka kvalitete proizvoda (Tuberoso i sur., 2016).

Znanstvenici sa Sveučilišta u Poznanu razvili su novi funkcionalni anti-dijabetički proizvod, raženi kruh sa šafranom. Konzumacija takvog kruha kod miševa hranjenih visokomasnom prehranom rezultirala je smanjenjem razine glukoze i triglicerida u krvi te povećanjem proizvodnje inzulina i poboljšanja funkcije β-stanica gušterače. Međutim, isti učinak su dobili i kada su miševi konzumirali samo šafran ili raženi kruh čime oba sastojka posebno mogu potencijalno pomoći u terapiji dijabetesa (Bajerska i sur., 2013).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Biljna tkiva

U ovom radu istraživanja su provedena na samoniklim šafranima, odnosno svojtama roda *Crocus* L. (*C. malyi* Vis., *C. reticulatus* Steven ex Adams te dvije podvrste *C. vernus* (L.) Hill. - ssp. *albiflorus* (Kit.) Asch. et Graebn. *i* -ssp. *vernus.* Podvrsta *C. vernus* ssp. *vernus* zastupljena je u dvije forme - ljubičastoj i bijeloj.

Analizirana biljna tkiva bila su latice, prašnici, tučci, stabljike i korijeni uzoraka označenih brojevima **1-24**, kao što je prikazano u Tablici 1.

Tablica 1. Popis i numeracija analiziranih samoniklih šafrana s pripadajućom lokacijom i godinom.

numeracija	**Vrsta**	**lokacija**	**godina**
1	*C. vernus* ssp. *albiflorus*	Općina Luka	2014.
2	*C. vernus* ssp. *albiflorus*	Novi Vinodolski	2014.
3	*C. vernus* ssp. *albiflorus*	Općina Jelenje	2014.
4	*C. vernus* ssp. *albiflorus*	Općina Jelenje	2014.
5	*C. vernus* ssp. *vernus* (ljubičasti)	Park prirode Medvednica	2014.
6	*C. vernus* ssp. *vernus* (ljubičasti)	Park prirode Samoborsko gorje	2014.
7	*C. vernus* ssp. *vernus* (ljubičasti)	Park prirode Papuk	2015.
8	*C. vernus* ssp. *vernus* (bijeli)	Baške Oštarije	2015.
9	*C. vernus* ssp. *vernus* (ljubičasti)	Baške Oštarije	2015.
10	*C. vernus* ssp. *vernus* (ljubičasti)	Nacionalni park Sjeverni Velebit	2015.
11	*C. vernus* ssp. *vernus* (bijeli)	Botanički vrt, Zagreb	2016.
12	*C. vernus* ssp. *vernus* (ljubičasti)	Botanički vrt, Zagreb	2016.
13	*C. vernus* ssp. *vernus* (ljubičasti)	Botanički vrt, Zagreb	2015.
14	*C. vernus* ssp. *vernus* (bijeli)	Čulinec, Zagreb	2016.

15	*C. vernus* ssp. *vernus* (ljubičasti)	Čulinec, Zagreb	2016.
16	*C. vernus* ssp. *vernus* (bijeli)	Grad mladih, Zagreb	2016.
17	*C. vernus* ssp. *vernus* (ljubičasti)	Grad mladih, Zagreb	2016.
18	*C. vernus* ssp. *vernus* (bijeli)	Čazma	2016.
19	*C. vernus* ssp. *vernus* (ljubičasti)	Čazma	2016.
20	*C. vernus* ssp. *vernus* (ljubičasti)	Park prirode Papuk	2016.
21	*C. reticulatus*	Park prirode Papuk	2013.
22	*C. reticulatus*	Park prirode Papuk	2013.
23	*C. malyi*	Park prirode Papuk	2015.
24	*C. malyi*	Nacionalni park Sjeverni Velebit	2015.

Uzorci su nakon sakupljanja podvrgnuti liofilizaciji i spremljeni za daljnje analize.

3.1.2. Kemikalije i reagensi

- Diklorfluorescein-diacetat (DCFH-DA), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Dimetilsulfoksid (DMSO), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Fetalni teleći serum, toplinski inaktiviran, Gibco (Carlsbad, SAD)
- Fosfatni pufer (PBS), pH= 7.4
- Klorovodična kiselina, (36,5%-tna), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- *Neutral red* (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid), Sigma (Steinhheim, Njemačka)
- Otopina za odbojavanje (1% ledena octena kiselina, 50% etanol, 49% voda)
- Stanični medij RPMI 1640 s L-glutaminom i 25 mM HEPES puferom (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina), Lonza, BioWhittaker (Walkersville, SAD)
- Tripsin, Gibco (Carlsbad, SAD)

3.1.3. Instrumenti i pribor

Za potrebe ekstrakcije i HPLC analize korišteni su:

- Analitička vaga, Precisa 62A, Precisa balances (Švicarska)
- Centrifuga, Hettich Mikro 220R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Njemačka)
- Eppendorf epruvete, 1,5 mL, Eppendorf AG (Njemačka)
- Mikropipete, 10-1000 µL, Eppendorf (Hamburg, Njemačka)
- RP-HPLC Agilent 1100 Series, Agilent Technologies (SAD)
- Staklene čaše, 20 mL
- Termometar
- Termomikser, Thermomixer comfort, Eppendorf (Njemačka)
- Vrtložna mješalica, TecnoKartell TK3, Kartell (Italija)

Za biološke testove korišteni su:

- FLUOStar Optima, Bmg LabTech's (Njemačka)
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO_2, Forma Scientific (SAD)
- Komora za sterilni rad, Iskra (Slovenija)
- Mikropipete, 10-1000 µL, Eppendorf (Hamburg, Njemačka)
- Mikrotitarske pločice s 96 bunarića, Falcon BD Company (Fanklin Lakes, SAD)
- Plastične Petrijeve zdjelice, Aptaca (Canelli, Italija)
- Staklene epruvete volumena 3- 10 mL
- Staklene pipete volumena 5 mL, 10 mL i 20 mL
- Svjetlosni mikroskop/invertni svjetlosni mikroskop
- T-boce, Falcon, BD Company (Franklin Lakes, SAD)
- Tikvice s ravnim dnom volumena 100- 1000 mL
- Türken- Bürkova komora

3.2. METODE RADA

3.2.1. Optimizacija ekstrakcije

Prije HPLC analize provedena je optimizacija postupka ekstrakcije da bi se odredili najbolji uvjeti ekstrakcije za identifikaciju i kvantifikaciju flavonoida HPLC metodom. Optimizacija je provedena na uzorku latica. Ispitivani parametri bili su: vrsta otapala, temperatura otapala, vrijeme ekstrakcije te upotreba ultrazvučne kupelji.

3.2.1.1. Vrsta i temperatura otapala

Suha tkiva su usitnjena tučkom u tarioniku. Uzorci su pripremljeni tako da je u epruvete (1,5 mL) izvagana masa tkiva i dodano je toliko otapala da masena koncentracija iznosi 50 mg mL^{-1} te su dodana sljedeća otapala: etanol (70%), deionizirana voda zagrijana na 80 °C i deionizirana voda zagrijana na 100 °C. Ekstrakcija 70%-tnim etanolom je provedena na sobnoj temperaturi u trajanju od 18 sati. Ekstrakcija vodom zagrijanom na 80 °C provedena je u termomikseru pri 80 °C, 30 minuta i 500 rpm-a. Kod ekstrakcije vodom zagrijanom na 100 °C, uzorci su nakon dolijevanja otapala stavljeni u posudu s vodom zagrijanom na 100 °C u trajanju od 30 minuta. Nakon provedenih ekstrakcija, uzorci su centrifugirani dva puta na 15 000 rpm 5 minuta te je odvojen supernatant za analizu na HPLC uređaju.

3.2.1.2. Vrijeme ekstrakcije i upotreba ultrazvučne kupelji

Uzorci biljnog tkiva su pripremljeni odvagom mase suhog tkiva u epruvete (1,5 mL) potrebne da masena koncentracija iznosi 20 mg mL^{-1} te je dodana deionizirana voda zagrijana na 80 °C. Jedna ekstrakcija je provedena u termomikseru pri 80 °C, 30 minuta i 500 rpm-a s tim da je dio uzoraka prethodno stavljen u ultrazvučnu kupelj na 15 minuta, a dio nije. Druga ekstrakcija je provedena u termomikseru pri 80 °C, 2 sata i 500 rpm te je također jedan dio uzoraka bio u ultrazvučnoj kupelji 15 minuta, a drugi dio nije. Nakon ekstrakcije uzorci su centrifugirani pri 15 000 rpm 5 minuta te je odvojen supernatant koji je korišten za analizu na HPLC uređaju.

3.2.2. Priprema ekstrakata

Postupak rada:

Suha biljna tkiva usitnjena su tučkom u tarioniku te su pripremljeni vodeni ekstrakti masene koncentracije 20 mg mL^{-1} na sljedeći način. U epruvete (1,5 mL) odvagana je određena masa usitnjenog suhog tkiva, dodana je deionizirana voda zagrijana na 80° C te su uzorci kratko promiješani na vrtložnoj mješalici. Zatim su stavljeni u termomikser na 80 °C, 30 minuta i pri 500 rpm-a. Nakon 30 minuta dobiveni ekstrakti centrifugirani su 5 minuta pri 15 000 rpm-a te su dobiveni supernatanati odvojeni u nove epruvete i spremljeni za daljnje analize na -20 °C.

Za tretman CaCo-2 stanica posebno su napravljena razrjeđenja sa staničnim medijem odabranih ekstrakata latica šafrana. Iz pripremljenog ekstrakta masene koncentracije 20 mg mL^{-1} napravljena su razrjeđenja koncentracija: 1000 μg mL^{-1}, 500 μg mL^{-1}, 100 μg mL^{-1}, 50 μg mL^{-1} i 10 μg mL^{-1} dodatkom odgovarajućeg volumena medija i ekstrakta.

3.2.3. Određivanje flavonoida metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (RP-HPLC)

Princip metode:

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti obrnutih faza (eng. *reverse phase - high performance liquid chromatography*, RP-HPLC) razdvaja molekule po načelu hidrofobnosti. Razdvanje ovisi o hidrofobnim interakcijama molekula ekstrakta s imobiliziranim hidrofobnim ligandima, odnosno stacionarnom fazom (Aguilar, 2004).

Postupak rada:

Za identifikaciju i kvantifikaciju flavonoida korišten je uređaj HPLC 1100 Series s UV/VIS detektorom. Razdvajanje je provedeno na Agilent Poroshell 120 SB-C18 koloni dimenzija 4,6x100 mm s veličinom čestica 2,7 μm. Mobilna faza A bila je smjesa 0,2%-tne octene kiseline i 10%-tnog acetonitrila, a mobilna faza B smjesa 0,2%-tne octene kiseline, 40%-tnog acetonitrila i 40%-tnog metanola. Brzina protoka otapala bila je 1 mL min^{-1}, a aplicirani volumen uzorka 15 μL. Za razdvajanje otapala korištena je metoda razvijena u Laboratoriju za fitokemiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Valna duljina pri kojoj su detektirani flavonoidi bila je 360 nm.

3.2.3.1. Analiza aglikona flavonoida

Za analizu aglikona flavonoida korišteni su hidrolizirani uzorci ekstrakata šafrana. Uzorci su hidrolizirani 1,2 M klorovodičnom kiselinom te inkubirani pri 80 °C, 300 rpm-a 2 sata.

Aglikoni su identificirani usporedbom retencijskih vremena pikova kromatograma dobivenih analizom ekstrakata s retencijskim vremenima pikova kromatograma dobivenih analizom standarda kvercetina, kempferola i izoramnetina.

3.2.3.2. Analiza glikozida flavonoida

U svrhu analize glikozida flavonoida korišteni su vodeni ekstrakti pripremljeni prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.2.

Glikozidi su identificirani usporedbom retencijskih vremena s retencijskim vremenima odabranih standarda: kvercetin-3,4'-di-*O*-glukozid, kvercetin-3-*O*-glukozid, kvercetin-*O*-ramnozid, kvercetin-3-*O*-rutinozid, kvercetin-3-*O*-galaktozid, kempferol-3-*O*-rutinozid, kempferol-3-*O*-glukozid i kempferol-7-*O*-neohesperidozid.

Za kvantifikaciju identificiranih pikova, dobiveni kromatogrami ekstrakata su integrirani, čime su dobivene površine ispod svakog pika. Baždarni pravci za svaki identificirani spoj definirani su analizom otopina različitih koncentracija odgovarajućeg standarda prema istoj metodi kao i za ekstrakte. Koristeći odgovarajuće baždarne pravce, iz vrijednosti očitanih površina identificiranih pikova u kromatogramima vodenih ekstrakata, izračunate su mase tih spojeva.

S obzirom da je količina sušenih latica, prašnika i tučaka bila ograničena te zbog uštede kemikalija, kod HPLC analize napravljene su tri biološke replike (n=3) samo ekstrakata latica koji su kasnije ispitani u biološkim testovima.

Rezultati su izraženi u mg identificiranog spoja kg^{-1} suhe tvari biljnog tkiva. Rezultati za mase odabranih latica su prikazane kao srednje vrijednosti s pripadajućim standarnim devijacijama.

3.2.4. Ispitivanje učinka ekstrakta latica samoniklih šafrana na stanice raka CaCo-2

3.2.4.1. Uzgoj stanica i priprema stanične suspenzije

Korištena je stanična linija heterogenih humanih stanica epitelnog kolorektalnog adenokarcinoma, CaCo-2. Prethodno uzgojene stanice u T-boci su pregledane pod mikroskopom da bi se provjerilo jesu li izrasle u dovoljnom broju, jesu li pričvršćene za dno i je li došlo do kontaminacije. Daljnji postupci su provedeni u komori za sterilni rad. Iz T-boce sa stanicama uklonjen je medij te je dodano 2 mL otopine tripsina laganim ispuštanjem iz pipete da bi se uklonili ostaci medija. Dodani volumen tripsina je uklonjen i ponovno je dodano 2 mL tripsina, ali ovaj put žustrijim ispuštanjem uz površinu na kojoj rastu stanice da bi došlo do njihovog odljepljivanja sa stijenke boce. T-boca sa stanicama i tripsinom je inkubirana na temperaturi od 37 °C 15 minuta u inkubatoru s 5% CO_2. Nakon inkubacije, T-boca sa stanicama je pregledana pod mikroskopom. Stanice su iz vretenastog oblika poprimile okrugli oblik i došlo je do njihovog pokretanja u smjeru kretanja tripsina čime je potvrđena uspješnost tretmana tripsinom (Freshney, 2000).

Točan broj stanica prisutan u staničnoj suspenziji s tripsinom određen je brojanjem u Turken-Burkovoj komori te je dodan volumen medija potreban da bi broj stanica u suspenziji iznosio 10^5.

3.2.4.2. Određivanje citotoksičnosti (Neutral Red metoda)

Princip metode:

Neutral red metoda je jedna od najčešće korištenih metoda kod određivanja citotoksičnog učinka u *in vitro* uvjetima. Temelji se na sposobnosti živih stanica da vežu *Neutral red* boju u lizosomima. *Neutral red* je slaba kationska boja koja ulazi u staničnu membranu ne-ionskom pasivnom difuzijom i koncentrira se u lizosomima gdje se veže elektrostatskim hidrofobnim vezama na anionske ili fosfatne grupe lizosomskog matriksa. Ako dođe do oštećenja stanice usred djelovanja ispitivane tvari stanice više nisu sposobne zadržati boju unutar lizosoma. Zbog toga, količina apsorbirane, odnosno oslobođene boje je proporcionalna broju živih stanica nakon tretmana ispitivanom tvari (Repetto i sur., 2008).

Postupak rada:

U prozirne mikrotitarske pločice s 96 bunarića nasađeno je po 100 µL prethodno pripremljene stanične suspenzije u svaki bunarić. Stanice su potom inkubirane 48 sati na temperaturi od 37

°C 15 minuta i pri 5% CO_2. Nakon toga uklonjen je medij iz svakog bunarića i stanice su tretirane pripremljenim ekstraktima latica šafrana tako što je u bunariće dodano po 100 µL ekstrakta različite koncentracije (1000 µg mL^{-1}, 500 µg mL^{-1}, 100 µg mL^{-1}, 50 µg mL^{-1} i 10 µg mL^{-1}). U kontrolne bunariće dodano je po 100 µL staničnog medija. Tretman ekstraktima je proveden 90 minuta u inkubatoru na temperaturi od 37 °C i pri 5% CO_2. Nakon isteka vremena tretmana, uklonjeni su ekstrakti iz bunarića i dodano je 100 µL PBS-a (fosfatni pufer) u svrhu uklanjanja ostataka ekstrakta. PBS je uklonjen i dodano je 100 µL 10%-tne otopine *Neutral red* boje koja je pripremljena razrijeđivanjem otopine *Neutral red* boje u etanolu (5 mg mL^{-1}) u staničnom mediju. Tako tretirane stanice su inkubirane 45 min na temperaturi od 37 °C i pri 5% CO_2, nakon čega su isprane s 100 µL PBS-a i dodano je 100 µL otopine za odbojavanje. Intenzitet obojenja izmjeren je pri valnoj duljini od 540 nm.

Postotak preživljenja izračunat je u odnosu na stanice u kontrolim bunarićima, prema formuli:

Preživljenje stanica (% u odnosu na kontrolu)= (A_{540} nm ekstrakta / A_{540} nm kontrole) x 100

Ispitivanje je provedeno u 4 paralelne probe, a eksperiment je ponovljen 2 puta (n=8). Rezultati su izraženi u postotcima (%) kao srednje vrijednosti s pripadajućim standarnim devijacijama.

3.2.4.3. Određivanje indukcije reaktivnih kisikovih vrsta (DCFH-DA metoda)

Princip metode:

Povišenje reaktivnih kisikovih vrsta (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS) pokazuje da je došlo do prooksidativnog, a smanjenje do antioksidativnog djelovanja. 2',7'-diklorofluorescein-diacetat (DCFH-DA) je neionski i nepolarni spoj koji difuzijom prolazi staničnu membranu te u stanici acetatne skupine bivaju hidrolizirane djelovanjem staničnih esteraza u 2',7'-diklorofluorescein. Nastali spoj je polaran zbog čega se zadržava u stanici i reagira s reaktivnim kisikovim vrstama te prelazi u fluorescentni spoj fluorescein. Intenzitet fluorescencije je proporcionalan količini nastalih kisikovih radikala u stanicama (Yang i sur, 1998).

Postupak rada:

Određivanje indukcije reaktivnih kisikovih vrsta rađeno je istovremeno kad i određivanje citotoksičnosti, odnosno iz iste stanične suspenzije i pod istim uvjetima eksperimenta. U crne mikrotitarske pločice s 96 bunarića nasađeno je po 100 µL predhodno pripremljene stanične suspenzije u svaki bunarić. Stanice su inkubirane 48 sati pri 37 °C 15 minuta i 5% CO_2. Nakon proteklog vremena, uklonjen je medij i dodano je 100 µL ekstrakta latica šafrana različitih

koncentracija (1000 μg mL^{-1}, 500 μg mL^{-1}, 100 μg mL^{-1}, 50 μg mL^{-1} i 10 μg mL^{-1}). U kontrolne bunariće dodano je 100 μL staničnog medija. Tretman ekstraktima je trajao isti vremenski period kao i kod određivanja citotoksičnosti, 90 minuta u inkubatoru na temperaturi od 37 °C i pri 5% CO_2. Nakon isteka vremena ekstrakti su uklonjeni i dodano je 100 μL otopine DCFH-DA u PBS-u (0,05 mM). Otopina je svježe pripremljena otapanjem odgovarajuće mase DCFH-DA u DMSO-u (dimetilsulfoksid) potrebne da koncentracija iznosi 2 mM. Zatim je takva otopina razrijeđena u PBS-u do koncentracije 0.05 mM. Nakon inkubacije od 15 minuta izmjeren je intenzitet fluorescencije pri valnoj dužini ekscitacije od 485 nm i valnoj dužini emisije 520 nm.

Indukcija reaktivnih kisikovih vrsta izračunata je u odnosu na stanice u kontrolnim bunarićima prema formuli:

Indukcija reaktivnih kisikovih vrsta (% u odnosu na kontrolu) = [(intenzitet flourescencije ekstrakta / % preživljenja stanica) / intenzitet flourescencije kontrole] x 100

Ispitivanje je provedeno u 4 paralelne probe, a eksperiment je ponovljen 2 puta (n=8). Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama, u postotcima (%).

3.2.5. Statistička obrada podataka

Obrada rezultata dobivenih HPLC analizom i biološkim testovima napravljena je pomoću Microsoft Office Excel 2013 programa. Statistička analiza rezultata bioloških testova napravljena je pomoću paketa SPSS Statistics 17.0. Korišten je *one-way* ANOVA statistički program uz granicu statističke značajnosti $p < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedena je optimizacija ekstrakcije flavonoidnih spojeva iz liofiliziranih dijelova samoniklih šafrana u svrhu daljnje analize flavonoida HPLC metodom.

Identificirani i kvantificirani su flavonoidni spojevi uz pomoć integracije površina na kromatogramima dobivenih HPLC analizom vodenih ekstrakata šafrana pripremljenih po dobivenoj optimalnoj metodi ekstracije. Analizirani su vodeni ekstrakti različitih biljnih dijelova (prašnici, tučci, latice, korijen, stabljika) da bi se ustanovilo koji dio ima najbogatiji flavonoidni sastav. Određeno je da su dijelovi cvijeta najbogatiji flavonoidima te su u njihovim ekstraktima detektirani i kvantificirani aglikoni flavonoida: kvercetin, izoramnetin i kempferol te glikozidi: kvercetin-3-*O*-glukozid, kvercetin-3,4'-di-*O*-glukozid i kempferol-3-*O*-rutinozid. Glikozidi su analizirani u vodenim ekstraktima, a aglikoni u uzorcima dobivenim hidrolizom tih ekstrakata. Za daljnju analizu odabrani su ekstrakti latica jer su sadržavali najviše identificiranih glikozida te na latice otpada najveći dio mase cvijeta.

Ispitan je biološki učinak nehidroliziranih vodenih ekstrakata latica samoniklih šafrana na stanicama raka debelog crijeva (CaCo-2 stanična linija) primjenom Neutral red metode u svrhu određivanja citotokičnosti i DCFH-DA metode u svrhu određivanja indukcije reaktivnih kisikovih vrsta.

Prema saznanju autora, u trenutku pisanja ovog rada nema dostupnih objavljenih radova u kojima su se provodile iste ili slične eksperimentalne metode na samoniklim šafranima (*C. malyi* Vis., *C. reticulatus* Steven ex Adams, *C. vernus* (L.) Hill. - ssp. *albiflorus* (Kit.) Asch. et Graebn. *i* -ssp. *vernus).* Zbog toga, dobiveni rezultati bit će uspoređivani s rezultatima radova o kultiviranom šafranu (*C. sativus* L.) i ostalim vrstama roda *Crocus.*

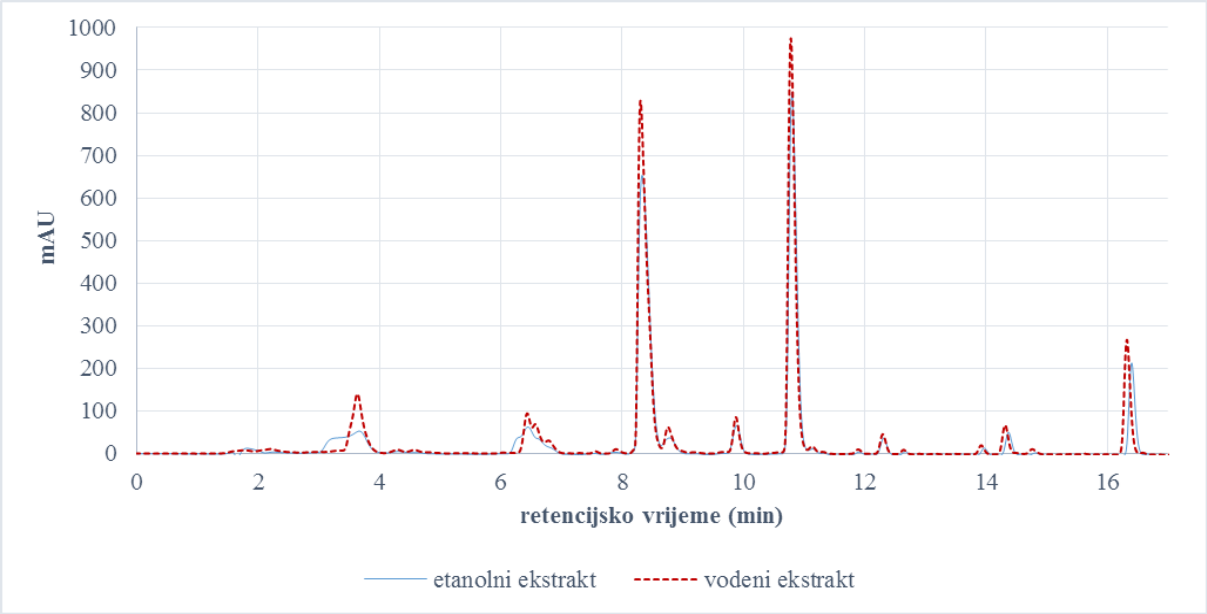
Uzorci su numerirani prema Tablici 1. poglavlja 3. Eksperimentalni dio.

4.1. OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE

4.1.1. Vrsta i temperatura otapala

U svrhu optimizacije ekstrakcije flavonoida iz šafrana korišteni su ekstrakti latica. Uspoređivana su tri različita otapala: voda pri 100 °C i 80 °C te 70%-tni etanol pri sobnoj temperaturi. Voda pri 100 °C kao otapalo eliminirana je pri početku eksperimenta. Naime, zbog isparavanja otapala nije bilo moguće dodati točan volumen otapala, a samim time niti odrediti

točnu koncentraciju otopine. Nadalje, u eksperimentu su korištene Eppendorf plastične epruvete koje se prema uputama proizvođača ne preporuča koristiti na temperaturi višoj od 100 °C (Eppendorf Inc., 2017). Na slici 7 prikazani su kromatogrami vodenog i etanolnog ekstrakta latice šafrana. Vidljivo je da je ekstrakcija vodom pri 80 °C pokazala bolje rezultate jer su pikovi ekstrahiranih spojeva viši što upućuje na veću ekstrahiranu količinu tih spojeva. Dodatni razlog zašto 70%-tni etanol nije odabran kao otapalo je drugi dio eksperimentalnog dijela ovog rada, odnosno praćenje biološkog učinka ekstrakata šafrana na CaCo-2 staničnoj liniji. Naime, etanol inducira apoptozu kod *in vitro* uzgojenih CaCo-2 stanica već pri koncentraciji od 5% i izloženosti od 60 minuta (Asai i sur., 2003) pa bi korištenje 70%-tnog etanola kao otapala moglo dati netočne rezultate određivanja citotoksičnosti ekstrakata latica šafrana. Zbog navedenih razloga, voda zagrijana na 80 °C odabrana je kao optimalno otapalo za ekstraciju flavonoida iz šafrana i istraživanje njihovog biološkog učinka.



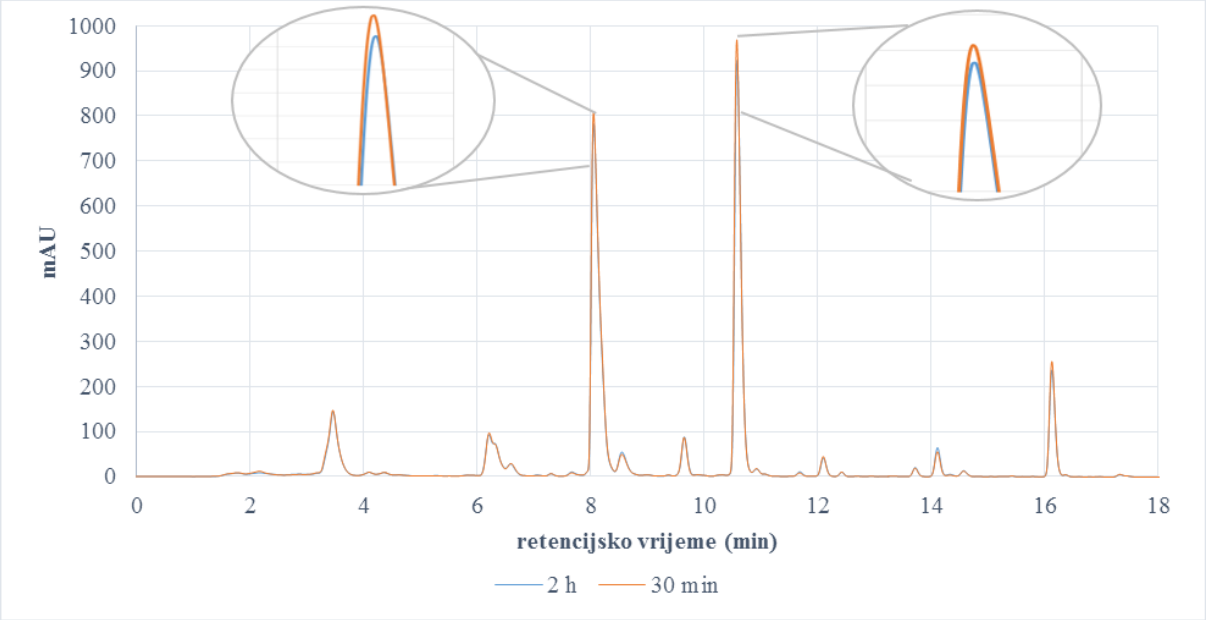
Slika 7. Usporedni kromatogrami etanolnog (70%-tni) i vodenog ekstrakta latica šafrana

Serrano-Díaz i suradnici (2014) su proučavali utjecaj različitih otapala (voda, voda:HCl, etanol, etanol:HCl, diklorometan i heksan) na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu bio-otpada proizvodnje začina šafrana (latice, prašnici, vratovi tučaka). Vodeni ekstrakt je uvjerljivo imao najviše ukupnih polifenola u usporedbi s drugim ekstraktima. Također je sadržavao više pojedinačnih glikozida kempferola, kvercetina, izoramnetina i delfinidina. Prema navedenim rezultatima vidljivo je da je vodeni ekstrakt pogodan za uspješnu ekstrakciju polifenola te posebice glikozida flavonoida koji su identificirani i kvantificirani u ovome diplomskom radu.

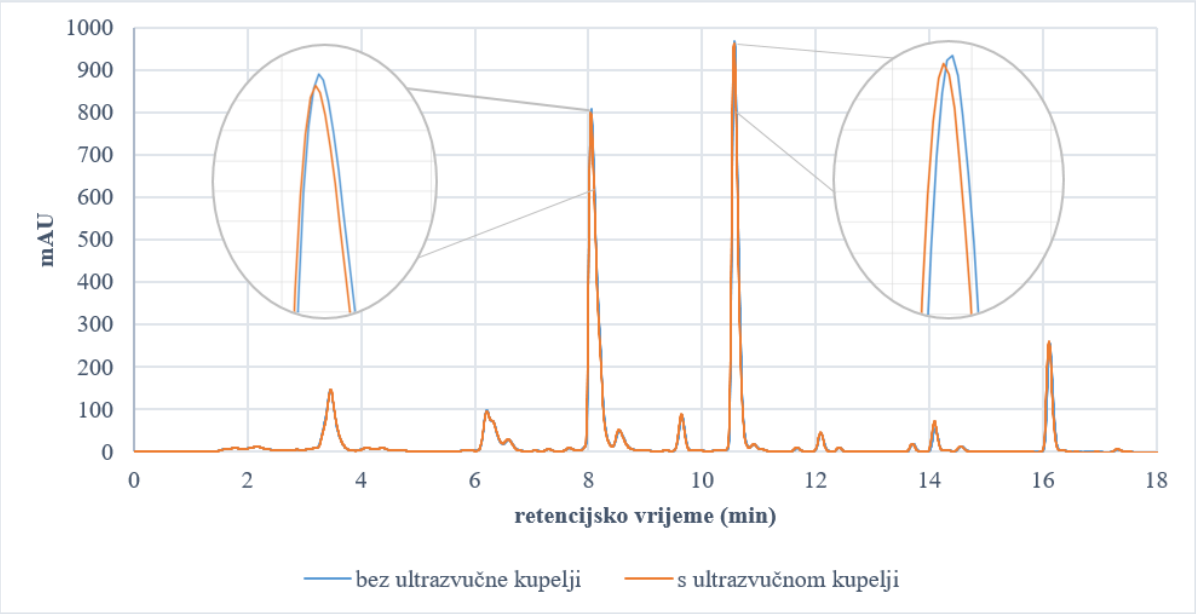
4.1.2. Vrijeme ekstrakcije i upotreba ultrazvučne kupelji

Drugi parametar koji je promatran tijekom optimizacije ekstrakcije bilo je vrijeme ekstrakcije, 30 minuta ili 2 sata u termomikseru. Slika 8 prikazuje kromatogram na kojem je vidljivo da produljeno vrijeme ekstrakcije od 2 sata nije rezultiralo značajno boljom ekstrakcijom polifenolnih spojeva u usporedbi s 30 minuta.

Istražen je i utjecaj upotrebe ultrazvučne kupelji na uspješnost ekstrakcije, ali kako je prikazano na slici 9, kromatogrami ekstrakata dobivenih s i bez upotrebe ultrazvučne kupelji se vrlo malo razlikuju pa se može zaključiti da upotreba ultrazvučne kupelji nije značajno pospješila ekstrakciju. Na temelju rezultata koji su pokazali jako male razlike kod ekstrakcije 30 minuta i 2 sata te s i bez ultrazvučne kupelji, kao i zbog manjeg utroška vremena i kemikalija, odlučeno je ekstrakciju provesti 30 minuta i bez upotrebe ultrazvučne kupelji.



Slika 8. Usporedni kromatogrami ekstrakcije provedene 30 minuta i 2 sata



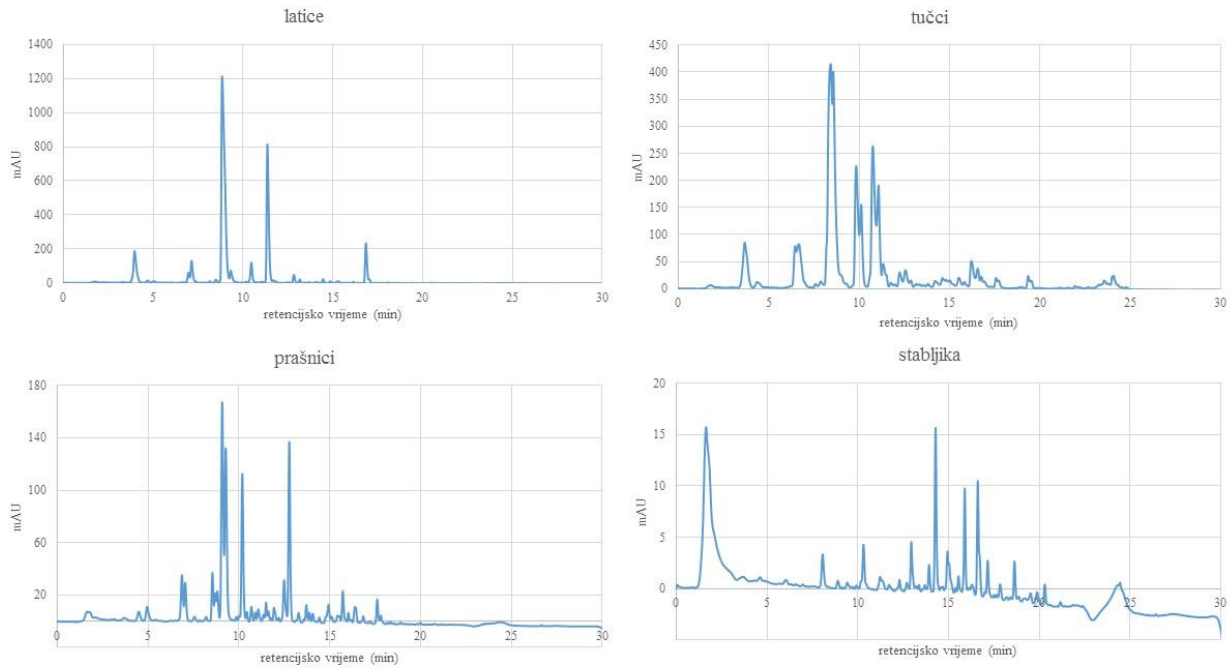
Slika 9. Usporedni kromatogrami ekstrakcije provedene uz ili bez upotrebe ultrazvučne kupelji

4.2. IDENTIFIKACIJA I KVANTIFIKACIJA GLIKOZIDA I AGLIKONA FLAVONOIDA METODOM TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)

Preliminarnom analizom kromatograma ustanovljeno je da su nehidrolizirani vodeni ekstrakti dijelova cvijeta (prašnika, tučaka i latica) bogatiji flavonoidima od ekstrakata korijena i stabljike pa je daljnja identifikacija i kvantifikacija flavonoida provedena na ekstraktima dijelova cvijeta. Prvom analizom identificirani su flavonoidi prisutni u ekstraktima pojedinačnih dijelova cvijeta te je izračunata njihova masa. Nakon analize podataka i pregleda literature zaključeno je da bi najbolje bilo daljnju analizu provesti na laticama jer čine najveći dio mase cvijeta, slabije su istražene od tučaka te su bogate flavonoidnim spojevima. Zbog premale mase suhe tvari nisu analizirani ekstrakti tučaka uzoraka **1, 2, 3, 7, 8, 12, 21, 22** i **23**, prašnika uzoraka **3, 8** i **22**, te latica uzoraka **13, 17, 18** i **20**.

Usporedni kromatogrami ekstrakata prašnika, tučaka, latica i stabljike bijele forme *C. vernus* ssp. *vernus* iz Botaničkog vrta, 2016. g. **(11)** prikazani su na slici 10. Vidljivo je da su jedinice apsorbancije (mAU) ekstrahiranih spojeva najviše na kromatogramu ekstrakta latica (preko 1200 mAU), a najmanje na kromatogramu ekstrakta stabljike (do 20 mAU). U ekstraktu

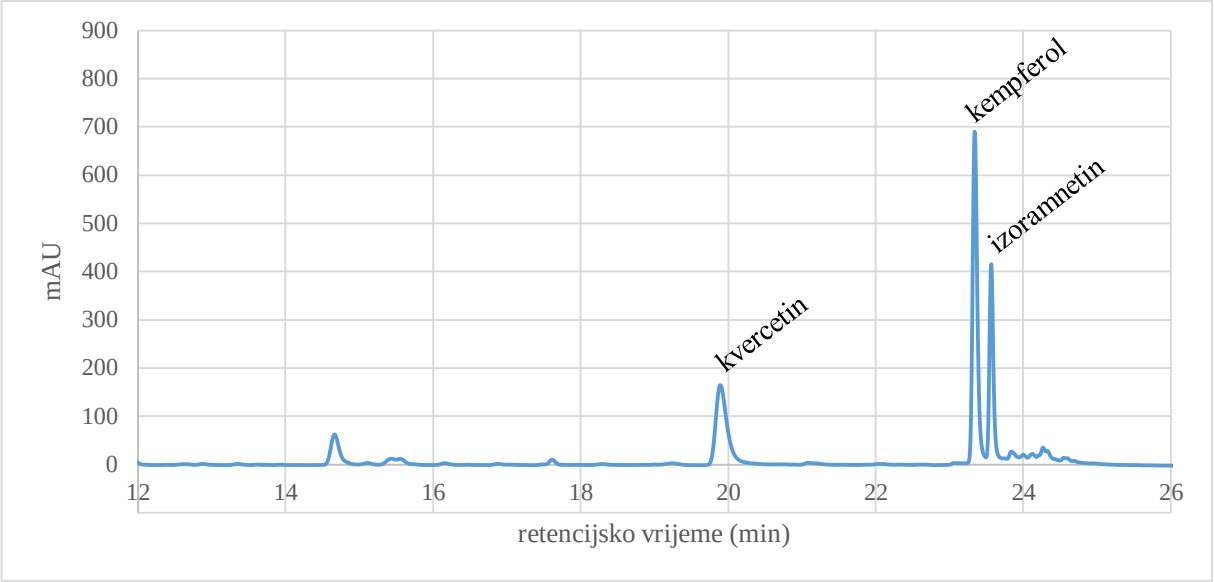
prašnika i stabljike ekstrahirano je najviše pojedinačnih spojeva, što se vidi po broju pikova na kromatogramu, dok je u ekstraktu latica broj pikova najmanji.



Slika 10. Kromatogrami različitih biljnih tkiva istog uzorka (bijela forma podvrste *C. vernus* ssp. *vernus*, Botanički vrt, 2016. g., **11**)

4.2.1. Analiza aglikona flavonoida

Analizirani aglikoni su određeni samo u hidroliziranim ekstraktima jer su nehidrolizirani ekstrakti sadržavali minimalne količine aglikona, odnosno njihove količine bile su na granici kvantifikacije. Primjer kromatograma hidroliziranog ekstrakta prikazan je na slici 11. Prikazuje pikove kvercetina (19,7 min), kempferola (23,3 min) i izoramnetina (23,5 min) u hidroliziranom ekstraktu prašnika bijele forme podvrste *C. vernus* ssp. *vernus* iz Čazme, 2016. g. **(18)**.



Slika 11. Detektirani aglikoni u hidroliziranom ekstraktu prašnika bijele forme podvrste *C. vernus* ssp. *vernus,* Čazma, 2016. g. **(18)**

Kakouri i suradnici (2017) su metodom tekućinske kromatografije s masenom spektrometrijom (LC-DAD/MS) u hidroliziranom metanolnom ekstraktu cvijeta *C. sativus* L. odredili dominantne aglikone. Kempferol je činio 42,8%, a kvercetin 2,4% ukupne površine pikova kromatograma. Nørbæk i suradnici (2002) su ustanovili da je kempferol dominantni aglikonski dio te da njegovi glikozidi čine 70-90% ukupnih flavonoida vrsta roda *Crocus* L., dok kvercetin glikozidi čine od 5-10%, a ostalo otpada na izoramnetin, miricetin i apigenin glikozide. Treba napomenuti da su u navedenom istraživanju analizirani kultivari, a ne samonikle vrste. Prema kromatogramu ekstrakta prašnika sa slike 11 vidljivo je da u tom uzorku značajan dio glikozida ima molekulu izoramnetina kao aglikonski dio.

U tablici 2 prikazani su Pearsonovi korelacijski koeficijenti očitanih masa aglikona kvercetina, izoramnetina i kempferola za uzorke latica, prašnika i tučaka. Mase kempferola i kvercetina u uzorcima latica pokazale su visoku međusobnu korelaciju, što znači da masa kempferola raste zajedno s masom kvercetina, odnosno ako je u uzorku nađena velika masa kempferola, vrlo vjerojatno uzorak ima i veliku količinu kvercetina i obratno. U uzorcima prašnika visoki koeficijenti korelacije uočeni su za sva tri aglikona, a najveći je između masa kvercetina i kempferola. U uzorcima tučaka korelacija između mase kvercetina i kempferola te kempferola i izoramnetina nije statistički značajna, a korelacija između mase kvercetina i izoramnetina je neznatna.

Tablica 2. Prikaz korelacijskih koeficijenata između masa aglikona kvercetina, kempferola i izoramnetina ($p<0,01$).

latice			
	kvercetin	*kempferol*	*izoramnetin*
kvercetin	1		
kempferol	0,967	1	
prašnici			
	kvercetin	*kempferol*	*izoramnetin*
kvercetin	1		
kempferol	0,980	1	
izoramnetin	0,965	0,969	1
tučci			
	kvercetin	*kempferol*	*izoramnetin*
kvercetin	1		
kempferol	0,366	1	
izoramnetin	0,124	0,263	1

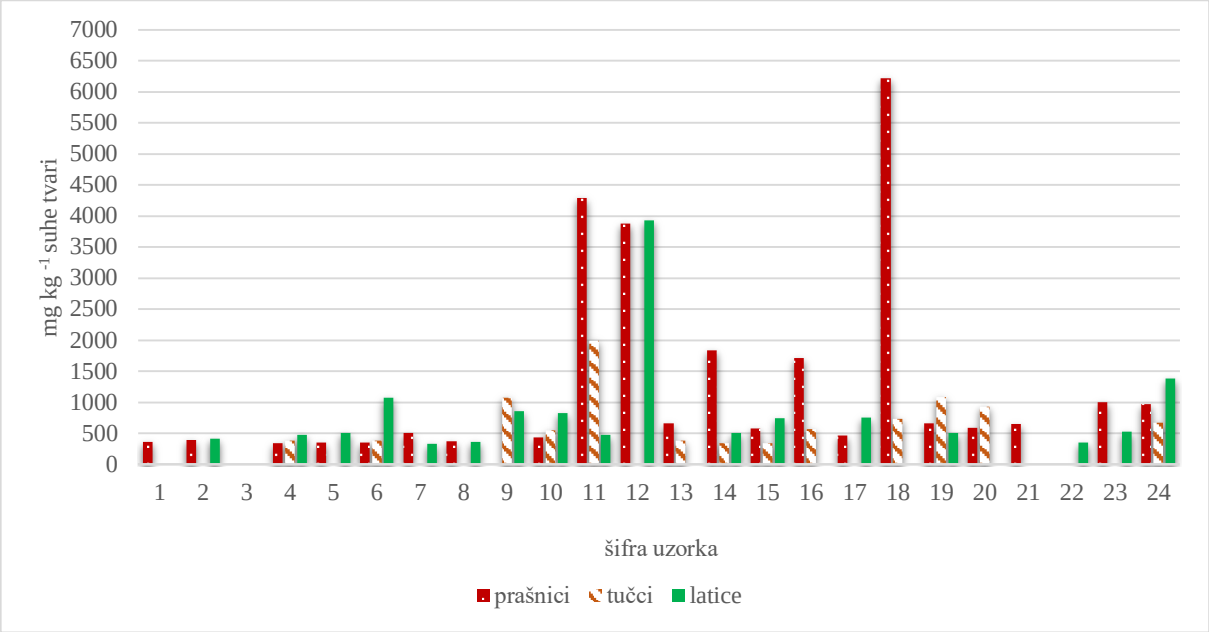
Na slici 12 prikazane su mase kvercetina u dijelovima cvijeta. Najveća masa kvercetina (mg kg^{-1} suhe tvari uzorka) zabilježena je u uzorku prašnika (6215,79) bijele forme *C. vernus* ssp. *vernus* iz Čazme, 2016. g. **(18)**, prašnika (4291,43) bijele forme *C. vernus* ssp. *vernus* iz Botaničkog vrta, Zagreb, 2016. g. **(11)** te latica (3928,18) i prašnika (3879,31) ljubičaste forme *C. vernus* ssp. *vernus* iz Botaničkog vrta, Zagreb, 2016. g. **(12)**.

Prosječna masa kvercetina (1269 mg kg^{-1} suhe tvari) svih uzoraka prašnika bila je najveća u odnosu na prosječne mase kvercetina svih uzoraka latica (520 mg kg^{-1} suhe tvari) i tučaka (627 mg kg^{-1} suhe tvari).

Na slici 13 prikazane su mase izoramnetina u dijelovima cvijeta u prašnicima i tučcima, dok je u laticama ovaj aglikon nađen tek u tragovima pa stoga vrijednosti nisu prikazane na slici. Vidljivo je da su tučci dominantni po pitanju izoramnetina jer su ga u prosjeku (1761 mg kg^{-1} suhe tvari) sadržavali više nego prašnici (533 mg kg^{-1} suhe tvari). Najveće mase izoramnetina (mg kg^{-1} suhe tvari) očitane su u tučcima (9843,60) bijele forme *C. vernus* ssp. *vernus* iz Čazme, 2016. g. **(16)**, tučcima (5912,99) iste podvrste iz Grada mladih, 2016. g. **(18)** i Baških Oštarija, 2015.g. (3690,06) **(9)**.

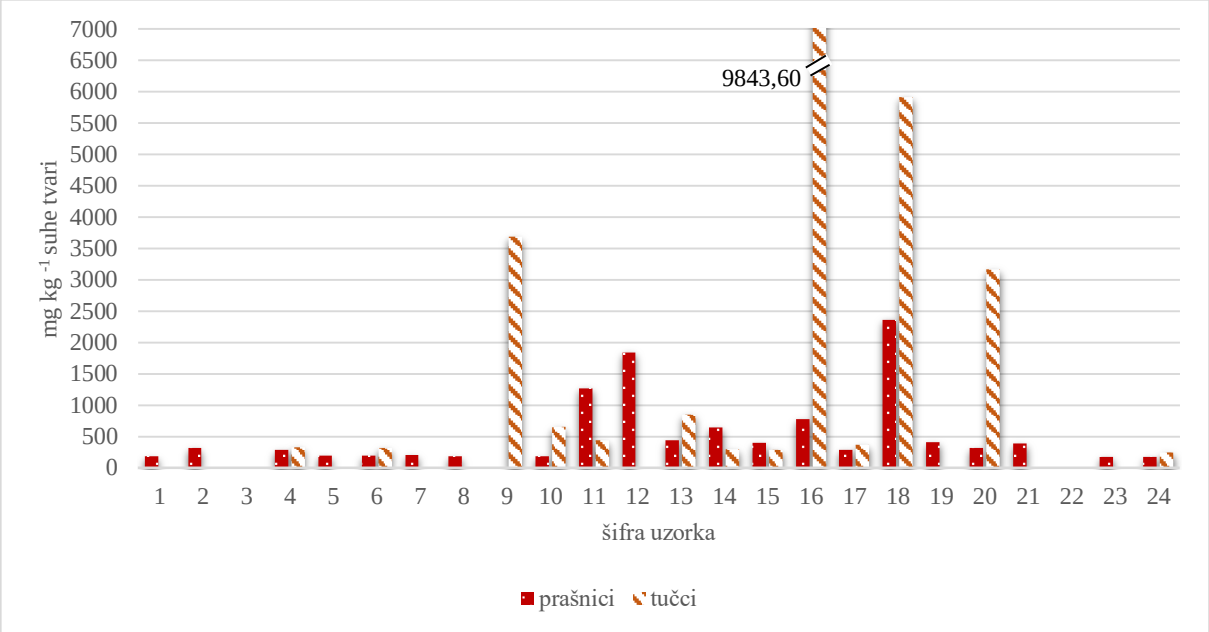
Tučci su također sadržavali i najveću prosječnu masu kempferola (5520 mg kg^{-1} suhe tvari), ali kao što je prikazano na slici 14 neki uzorci veoma odskaču od prosjeka. Za razliku od kvercetina i izoramnetina, kempferol je identificiran u svim analiziranim prašnicima, tučcima i laticama.

Najveća masa kempferola (mg kg^{-1} suhe tvari) očitana je u tučcima (39074,19) ljubičaste forme *C. vernus* ssp. *vernus* iz Čazme, 2016. g. **(19)**, zatim u tučcima (24541,00) bijele forme *C. vernus* ssp. *vernus* iz Grada mladih, 2016. g. **(16)**, laticama (10322,11) ljubičaste forme *C. vernus* ssp. *vernus* iz Botaničkog vrta u Zagrebu, 2016. g. **(12)** te u tučcima (9510,96) bijele forme iste podvrste i lokacije **(11)** što prikazuje slika 14.



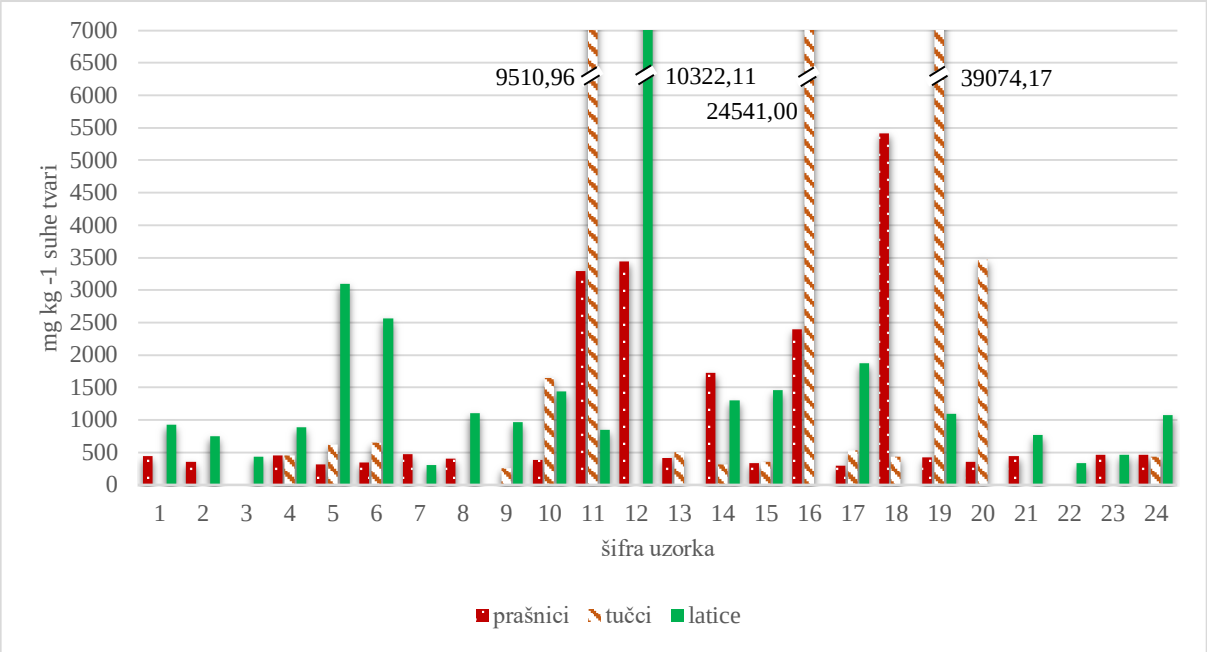
Slika 12. Zastupljenost kvercetina u prašnicima, tučcima i laticama samoniklih šafrana

*u tragovima – (tučci 5, 16 i latice 1, 3, 4, 17)



Slika 13. Zastupljenost izoramnetina u prašnicima i tučcima samoniklih šafrana

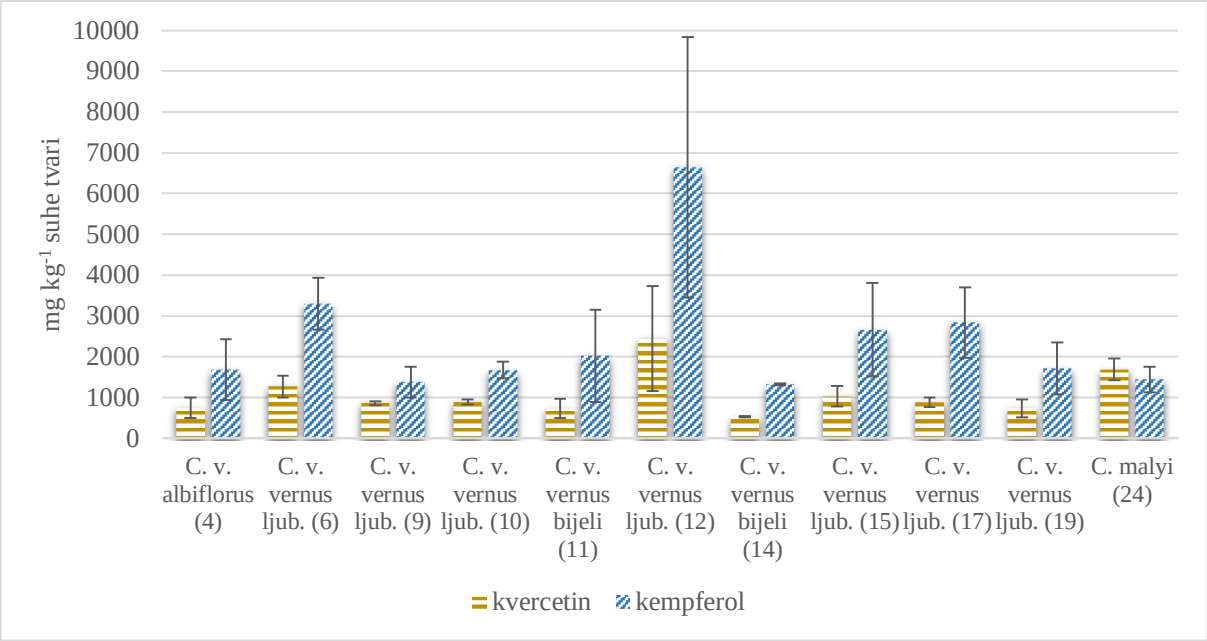
* u tragovima – tučci 5 i 19



Slika 14. Zastupljenost kempferola u prašnicima, tučcima i laticama samoniklih šafrana

Nadalje, najveća masa kempferola u tučcima **(16)** je 100 puta veća od najmanje **(9)**, a radi se o uzorcima iste vrste. Takva razlika, a i ostale značajne varijacije u masama kvercetina, kempferola i izoramnetima među analiziranim uzorcima s različitih lokacija mogu se objasniti utjecajem podneblja i vremenskih uvjeta na sadržaj flavonoida, odnosno glikozida flavonola u dijelovima šafrana. Sadržaj glikozida flavonola u biljnom tkivu uvelike ovisi o izloženosti suncu jer je njihova biosinteza stimulirana sunčevom svjetlošću. Značajne razlike u koncentraciji glikozida, a time i aglikona koji je u strukturi tih glikozida, uočene su između plodova voća koje raste na istom drvetu te čak i između različitih strana iste voćke gdje je jedna strana bila više, a druga manje izložena suncu. U zelenom lisnatom povrću kao što je kupus i zelena salata, koncentracija glikozida može biti više od 10 puta veća u vanjskim u odnosu na unutarnje listove (Manach i sur., 2004).

Na slici 15 prikazane su srednje vrijednosti masa kvercetina i kempferola određenih u odabranim laticama. Latice ljubičaste forme *C. vernus* ssp. *vernus* iz Botaničkog vrta u Zagrebu, 2016. g. **(12)** sadržavale su najveću količinu oba aglikona. Zanimljivo je da je u uzorcima latica **11** i **12** te **14** i **15**, bijele i ljubičaste forme *C. vernus* ssp. *vernus*, sakupljenih iste godine s iste lokacije utvrđena razlika u sadržaju aglikona. Bijela forma (**11**, **14**) je sadržavala manje i kvercetina i kempferola u odnosu na ljubičastu (**12**, **15**).



Slika 15. Srednje vrijednosti masa kvercetina i kempferola u odabranim laticama samoniklih šafrana

Zeka i suradnici (2015) su u suhim laticama šafrana vrste *C. sativus* L., nakon hidrolize metanolnog ekstrakta klorovodičnom kiselinom, identificirali i izolirali kempferol primjenom HPLC-DAD metode. Dobivena masa kempferola iznosila je 126 mg g^{-1}, odnosno 126 000 mg kg^{-1} suhih latica šafrana. Uspoređujući navedene rezultate i rezultate ovog rada, vidljivo je da su navedeni autori identificirali puno veću masu kempferola u laticama *C. sativus* L. nego što je u ovom radu identificirano u laticama podvrste C. *vernus* ssp. *vernus* **(12)** u kojima je određena najveća masa kempferola među uzorcima latica.

Jedan od razloga može biti korištenje različitih otapala. Naime, ekstrakcija flavonoida iz biljnih tkiva primjenom metanola daje bolje rezultate nego ekstrakcija primjenom vode. Butsat i Siriamornpun (2016) su uspoređivali utjecaj različitih otapala na sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima listova vrste *Amomum chinense*. Ekstrakcija 80%-tnim metanolom je dala 7 puta veću količinu flavonoida (mg katehina/g suhe tvari) nego ekstrakcija vodom. Međutim, treba uzeti u obzir da flavonoidi čine veliku skupinu spojeva različitih struktura i polarnosti pa ekstrakcija jednog flavonoida može biti bolja primjenom metanola, a ekstrakcija nekog drugog flavonoida bolja primjenom vode.

Još jedan od razloga za manju dobivenu masu kempferola, a potencijalno i ostalih analiziranih aglikona, je to što su aglikoni relativno hidrofobne molekule i time slabo topivi u vodi (Zeka i

Arro, 2016) pa je nakon hidrolize klorovodičnom kiselinom došlo do taloženja istih što je bilo vidljivo i nakon provedenog eksperimenta jer je u ekstraktima bio prisutan talog.

Zeka i suradnici (2015) također nisu detektirali značajnu količinu kempferola u nehidroliziranim ekstraktima, što upućuje na to da je sav ili većina kempferola prisutno u obliku glikozida. Acar i suradnici (2011) su u metanolnim ekstraktima turske endemske vrste šafrana (*Crocus baytopiorum*) detektirali male količine aglikona kempferola (35,06 ± 0,61 mg kg^{-1} suhe tvari) i kvercetina (56,36 ± 2,17 mg kg^{-1} suhe tvari).

Rezultati ovog rada su u suglasnosti s rezultatima navedenih autora jer nisu identificirane značajne količine aglikona kempferola kao ni kvercetina i izoramnetina u nijednom analiziranom nehidroliziranom ekstraktu latica pa je vjerojatno također većina ovih spojeva prisutna u obliku glikozida.

Bogati izvori kvercetina među hranom su komorač (4680 mg kg^{-1} suhe tvari), kopar (5515 mg kg^{-1} suhe tvari), brusnice (1734 mg kg^{-1} suhe tvari) i luk (1722 mg kg^{-1} suhe tvari) (Phenol-explorer 3.6). Prema tim podacima i latice **12**, tučci **11** te prašnici **11**, **12**, **14**, **16** i **18** mogu se smatrati bogatim izvorima kvercetina (Phenol-Explorer, 2017).

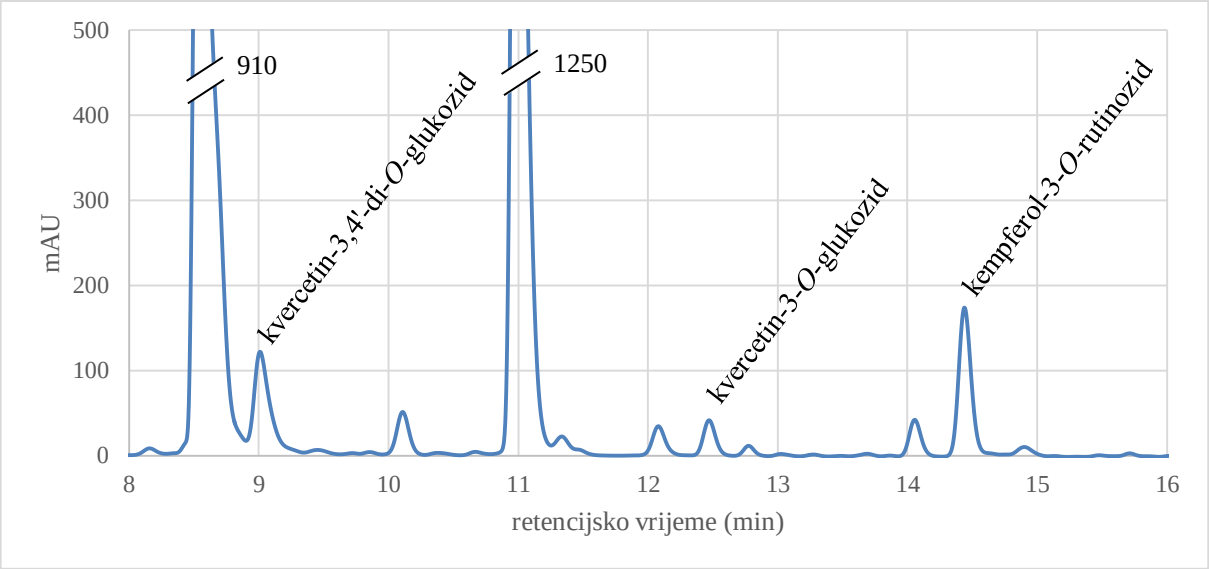
Podaci o izvorima izoramnetina u hrani su limitirani, ali kao neki od bogatijih izvora među začinima spominju se kopar (4350 mg kg^{-1} suhe tvari), komorač (930 mg kg^{-1} suhe tvari) i vlasac (675 mg kg^{-1} suhe tvari) na temelju čega zaključujem da tučci **9, 16, 18 i 20** te prašnici **11, 12** i **18** sadrže značajne količine izoramnetina (Phenol-Explorer, 2017).

Prema literaturi neki od bogatih prehrambenih izvora kempferola su kelj (2674 mg kg^{-1} suhe tvari), špinat (786 mg kg^{-1} suhe tvari) i brokula (565 mg kg^{-1} suhe tvari), što znači da se većina latica, prašnika i tučaka analiziranih u sklopu ovog istraživanja može svrstati u bogate izvore tog spoja (Phenol-Explorer, 2017).

Bitno je napomenuti da se HPLC analiza aglikona flavonoida u vodenim ekstraktima pokazala problematičnom s velikim razlikama u rezultatima među ponovljenim ekstrakcijama. Razlog tome je što nakon hidrolize ekstrakata dolazi do otpuštanja aglikona koji su slabo topljivi u vodi pa dolazi do njihovog taloženja. Stoga je analizu potrebno provesti brzo jer već nakon 24 sata u ekstraktu se istaloži više od polovice aglikona. Kao rezultat dobivena masa aglikona je manja od stvarne količine aglikona nastalih hidrolizom glikozida. Bolja opcija za analizu aglikona je primjena organskih otapala kao što su metanol, etanol ili etil-acetat u kojima su ovi spojevi dobro topivi.

4.2.2. Analiza glikozida flavonoida

Usporedbom retencijskih vremena standarda glikozida u vodenim ekstraktima identificirani su kvercetin-3-*O*-glukozid (12,5 min), kvercetin-3,4'-di-*O*-glukozid (9,4 min) i kempferol-3-*O*-rutinozid (14,4 min). Kromatogram nehidroliziranog ekstrakta latica ljubičaste forme *C. vernus* ssp. *vernus* iz Botaničkog vrta, 2016.g. **(12)** prikazan je na slici 16 kao primjer kromatograma nehidroliziranog ekstrakta. Dominantni pikovi (8,5 min i 11 min) nisu identificirani.



Slika 16. Detektirani glikozidi u ekstraktu latica ljubičaste forme *C. vernus* ssp. *vernus*, Botanički vrt, 2016.g. (**12**)

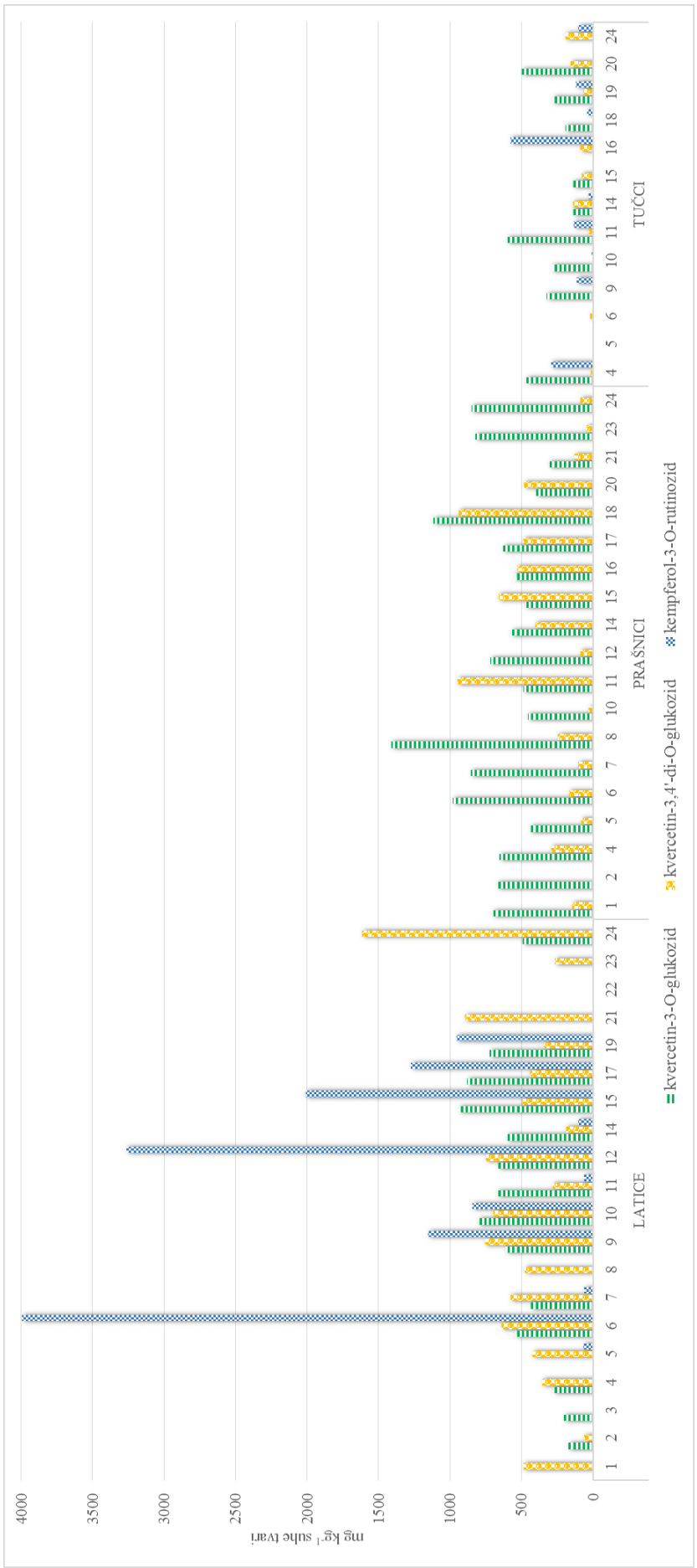
Najbogatiji kvercetin-3-*O*-glukozidom (1412,57 mg kg^{-1} suhe tvari) bili su prašnici bijele forme *C. vernus* ssp. *vernus* iz Baških Oštarija, 2015. g. **(8)**, a najviše kvercetin-3,4'-di-*O*-glukozida (1615,61 mg kg^{-1} suhe tvari) nađeno je u laticama *C. malyi* iz Nacionalnog parka Sj. Velebit, 2015.g **(24)**. Najviše kempferol-3-*O*-rutinozida (3993,56 mg kg^{-1} suhe tvari) sadržavale su latice ljubičaste forme *C. vernus* ssp. *vernus* iz parka prirode Samoborsko gorje, 2014. g. **(6)**.

Slika 17 prikazuje sastav tri glikozida u analiziranim biljnim tkivima. Vidljivo je da latice dominiraju po sadržaju kempferol-3-*O*-rutinozida. Međutim taj glikozid je nađen samo u podvrsti *C. vernus* ssp. *vernus,* dok ga svojte *C. vernus* ssp. *albiflorus, C. reticulatus* i *C. malyi* nisu sadržavale. Prašnici svih vrsta nisu sadržavali kempferol-3-*O*-glukozid što upućuje da nađena masa aglikona kempferola u hidroliziranim ekstraktima prašnika te latica navedenih svojti potječe od drugih glikozida kempferola. Latice su sadržavale i najveću prosječnu masu (mg kg^{-1} suhe tvari) kvercetin-3,4'-di-*O*-glukozida (486,09), a prašnici kvercetin-3-*O*-glukozida

(688,30). I drugi autori su potvrdili da se sastav glikozida znatno razlikuje ovisno o svojti roda *Crocus* L. Kempferol-3-*O*-soforozid i izoramnetin-3,7'-di-*O*-glukozid su karakteristični predstavnici za vrstu *C. sativus* L. dok ga neki drugi šafrani uopće nemaju u svom sastavu. Smatra se da su za to odgovorni geni koji kodiraju za nastanak UDP-glukoziltransferaza enzima koji su ključni za sintezu flavonola u biljkama. Ekspresija tih gena u cvjetnim dijelovima šafrana direktno utječe na flavonolni sastav te bi njihovo proučavanje moglo pomoći pri identifikaciji kemijskog sastava i razlikovanju različitih vrsta šafrana (Ahrazem i sur., 2015).

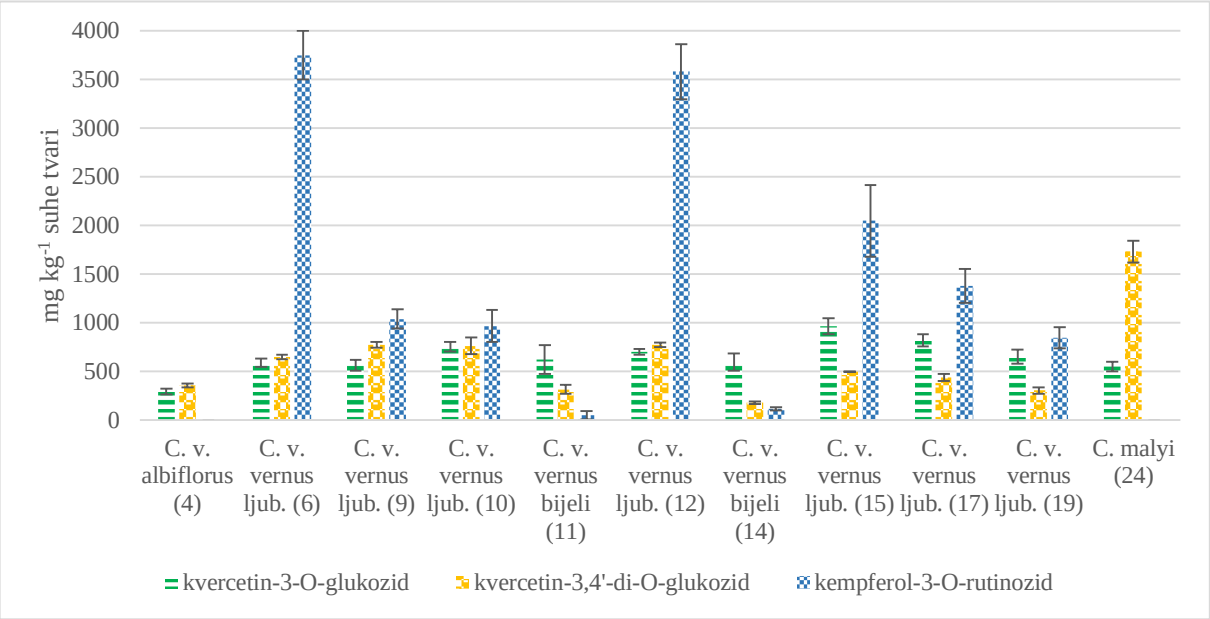
Pregledom literature utvrđeno je da među glikozidima flavonoida vrste *C. sativus* L. kempferol-3-*O*-soforozid količinski dominira u ekstraktima latica (Tuberoso i sur., 2016, Goupy i sur., 2013), prašnika (Vignolini i sur., 2008) i tučaka (Carmona i sur., 2007), ali identificirane su i značajne količine drugih glikozida.

Goupy i suradnici (2013) su koristeći UPLC metodu po prvi put detektirali izoramnetin-3-*O*-soforozid, kempferol-3-*O*-rutinozid i kvercetin-3-*O*-glukozid-7-*O*-ramnozid u metanolnom ekstraku latica vrste *C. sativus* L. uzgojene u Francuskoj. Također su identificirali i kvercetin-3-*O*-glukozid koji je određen u samoniklim šafranima ovog rada. Masa kempferol-3-*O*-rutinozida iznosila je 260 ± 0,03 mg kg^{-1} suhe tvari, a kvercetin-3-*O*-glukozida 260 ±0,04 mg kg^{-1} suhe tvari. Serrano-Díaz i suradnici (2014) analizirali su sastav glikozida flavonoida u različitim ekstraktima bio-otpada (latice i prašnici) proizvodnje začina šafrana s područja Španjolske primjenom HPLC-DAD metode. I oni su identificirali kempferol-3-*O*-rutinozid (11,04 ± 0,26 mg kg^{-1} suhe tvari bio-otpada) u ekstraktu dobivenom primjenom vode sobne temperature kao otapala. Vrijednosti oba autora su manje od većine masa istih glikozida detektiranim u laticama i tučcima samoniklih šafrana ovoga rada. Na navedenim primjerima je vidljivo da vrijednosti glikozida mogu značajno varirati i među istom vrstom šafrana ovisno o podneblju gdje raste, metodi ekstrakcije i analize. Nørbæk i suradnici (2002) napravili su detaljnu kemotaksonomsku analizu vrsta roda *Crocus* L. iz botaničkog vrta Sveučilišta u Copenhagenu u Danskoj. Među njima bile su i *C. vernus* (L.) Hill i *C. reticulatus* Steven ex Adams. U obje vrste kvalitativno je određen kvercetin-3,4'-di-*O*-glukozid koji je nađen i u vrstama šafrana ovog diplomskog rada.



Slika 17. Mase glikozida u laticama, prašnicima i tučcima samoniklih šafrana

Slika 18 prikazuje prosječne mase kvercetin-3-*O*-glukozida, kvercetin-3,4'-di-*O*-glukozida i kempferol-3-*O*-rutinozida u odabranim laticama. Po sadržaju kvercetin-3-*O*-glukozida (962,19 ± 83,35 mg kg^{-1} suhe tvari) dominiraju latice ljubičaste forme *C. vernus* ssp. *vernus* iz Čulinca, 2016.g. **(15)**, a po sadržaju kvercetin-3,4'-di-*O*-glukozida (1732,18 ± 110,55 mg kg^{-1} suhe tvari) latice *C. malyi* iz Nacionalnog parka Sj. Velebit, 2015.g. **(24)**. Latice ljubičaste forme *C. vernus* ssp. *vernus* iz Parka prirode Samoborsko gorje, 2014.g. **(6)** sadrže najveću količinu kempferol-3-*O*-rutinozida (3750,41 ± 250,42 mg kg^{-1} suhe tvari), ali i latice iste podvrste i forme iz Botaničkog vrta, 2106.g. **(12)** sadrže veliku količinu tog glikozida (3580,89 ± 284,10 mg kg^{-1} suhe tvari).



Slika 18. Srednje vrijednosti masa glikozida u odabranim laticama samoniklih šafrana

Kakouri i suradnici (2017) kvalitativno su odredili glikoizde kvercetina i kempferola u metanolnom ekstraktu cvijeta vrste *C. sativus* L. Najveći postotak svih površina ispod pikova pripada kempferol-3,4'-di-*O*-glukozidu (55,1%), a detektirani su još kvercetin-3,4'-di-*O*-glukozid (7,4%) i kempferol-3-*O*-glukozid (5,5%). Latice analizirane u ovom radu također su sadržavale kvercetin-3,4'-di-*O*-glukozid.

Ranije spomenuta razlika između bijele i ljubičaste forme po pitanju aglikona, primjećena je i kod glikozida. U bijeloj formi **(11, 14)** je nađena manja količina sva tri glikozida u odnosu na ljubičastu, posebice kempferol-3-*O*-rutinozida. Također, samo latice bijele forme su sadržavale više glikozida kvercetina u odnosu na glikozid kempferola. S obzirom da je analizom aglikona (slika 15) utvrđena veća masa kempferola u odnosu na kvercetin u laticama bijele forme,

pretpostavljam da su u bijeloj formi *C. vernus* ssp. *vernus* prisutni glikozidi kempferola za koje nisam imala dostupne standarde pa ih nisam mogla identificirati.

Predstavnik vrste *C. vernus albiflorus* **(4)** te predstavnik vrste *C. malyi* **(24)** u laticama nisu sadržavali spoj kempferol-3-*O*-rutinozid koji je detektiran u svim laticama uzoraka *C. vernus* ssp. *vernus* vrste. Zanimljivo, isti spoj je nađen u tučcima uzorka **4** i **24** što upućuje na različitu distribuciju ovog spoja među vrstama roda *Crocus* L.

4.3. ISPITIVANJE BIOLOŠKOG UČINKA EKSTRAKTA LATICA SAMONIKLIH ŠAFRANA NA STANICAMA RAKA CaCo-2

U svrhu ispitivanja biološkog učinka korišteni su ekstrakti latica različitih svojti samoniklih šafrana. Ekstrakti latica su odabrani zbog toga što je HPLC analizom utvrđeno da sadrže najviše glikozida koji su prisutni u nehidroliziranim ekstraktima. Tretman stanica je odlučeno provesti s nehidroliziranim ekstraktima jer su dobiveni samo ekstrahiranjem primjenom vode pri 80 °C pa je njihov proces dobivanja jednostavniji za potencijalnu upotrebu u prehrambenoj industriji. Vellosa i suradnici (2011) su zabilježili visoko prooksidativno djelovanje pojedinačnih aglikona kempferola i kvercetina na crvene krvne stanice već pri niskim koncentracijama (3,5 μM, 5,3 μM, 2,3 μM) što dodatno ide u korist primjene nehidroliziranih ekstrakata.

Proučavan je učinak ekstrakta, a ne pojedinačnih detektiranih spojeva je su istraživanja pokazala da bioaktivni spojevi biljnih ekstrakata djeluju sinergistički. Asdaq i Inamdar (2010) su proučavajući antioksidativni učinak ekstrakta šafrana i izoliranog spoja krokina, ustanovili da ekstrakt ima bolji učinak na neutralizaciju slobodnih radikala nego izolirani krokin što se može objasniti sinergističkim djelovanjem svih spojeva u ekstraktu.

Odabrana stanična linija su heterogene humane stanice epitelnog kolorektalnog adenokarcinoma, CaCo-2. Rak debelog crijeva je treći najčešći oblik raka u muškaraca (poslije raka pluća i prostate), a drugi kod žena (poslije raka dojke). Samo 5-10% svih oboljelih slučajeva je genetički uvjetovan, a više od 70% je povezano sa životnim stilom i prehranom. Prema tome, oboljevanje od raka debelog crijeva bi se mogla značajno smanjiti promjenom prehrambenih i životnih navika (Duijnhoven i sur., 2009).

Stanice su tretirane ekstraktima 90 minuta jer bi dulji tretman mogao rezultirati nastajanjem toksičnih metaboličkih produkata ili bi moglo doći do razgradnje nestabilnih bioaktivnih

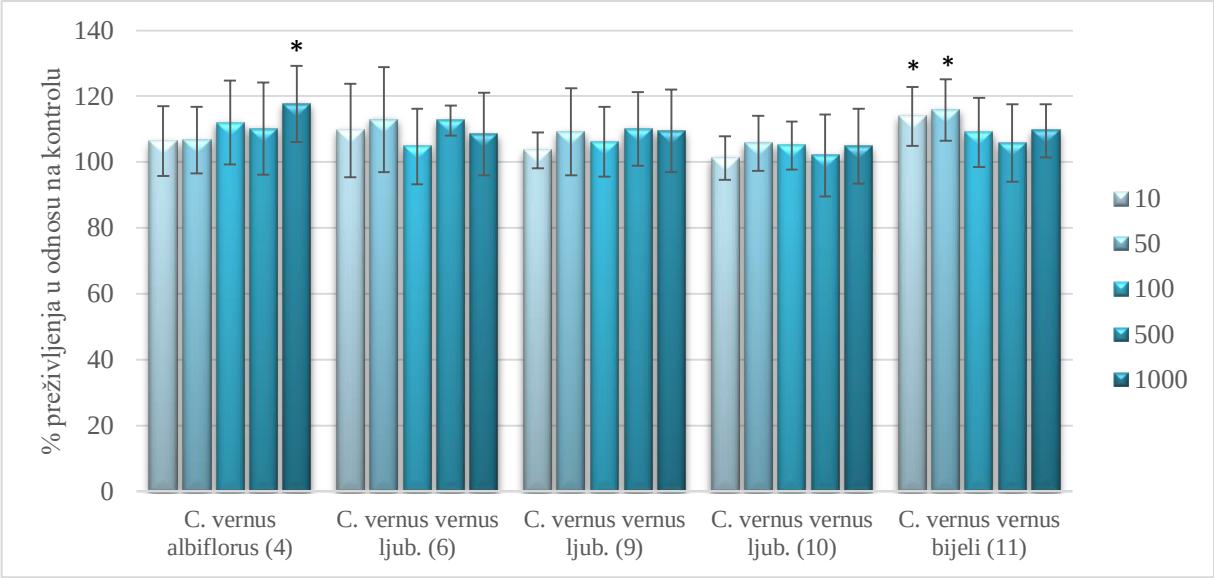
spojeva ekstrakata koji onda mogu opet djelovati toksično na stanice, primjerice iz kvercetina nastaje oksidirani oblik kvercetin-kvinon (D'Andrea, 2015).

Odabrani ekstrakti latica bile su latice uzoraka **4, 6, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 19** i **24**. Od toga jedan je uzorak podvrste *C. vernus* ssp. *albiflorus*, devet uzoraka podvrste *C. vernus* ssp. *vernus* te jedan uzorak vrste *C. malyi.*

4.3.1. Citotoksičnost

Na slikama 19 i 20 prikazan je citotoksični učinak u odnosu na kontrolu nakon tretmana ekstraktima latica šafrana 90 minuta. Statistički značajan proliferativni učinak na stanice raka CaCo-2 u odnosu na kontrolne stanice uočen je kod tretmana ekstraktom uzorka **4** koncentracije 1000 μg mL^{-1}, zatim uzorka **11** koncentracija 10 i 50 μg mL^{-1}, uzorka **17** koncentracija 100, 500 μg mL^{-1}, 1000 μg mL^{-1}te uzorka **19** pri koncentraciji od 100 μg mL^{-1}. U svim navedenim uzorcima radi se o povišenju preživljenja u odnosu na kontrolne stanice što znači da je vjerojatno došlo do lagane indukcije proliferacije stanica. U nijednom analiziranom uzorku nije uočen statistički značajan citotoksični učinak.

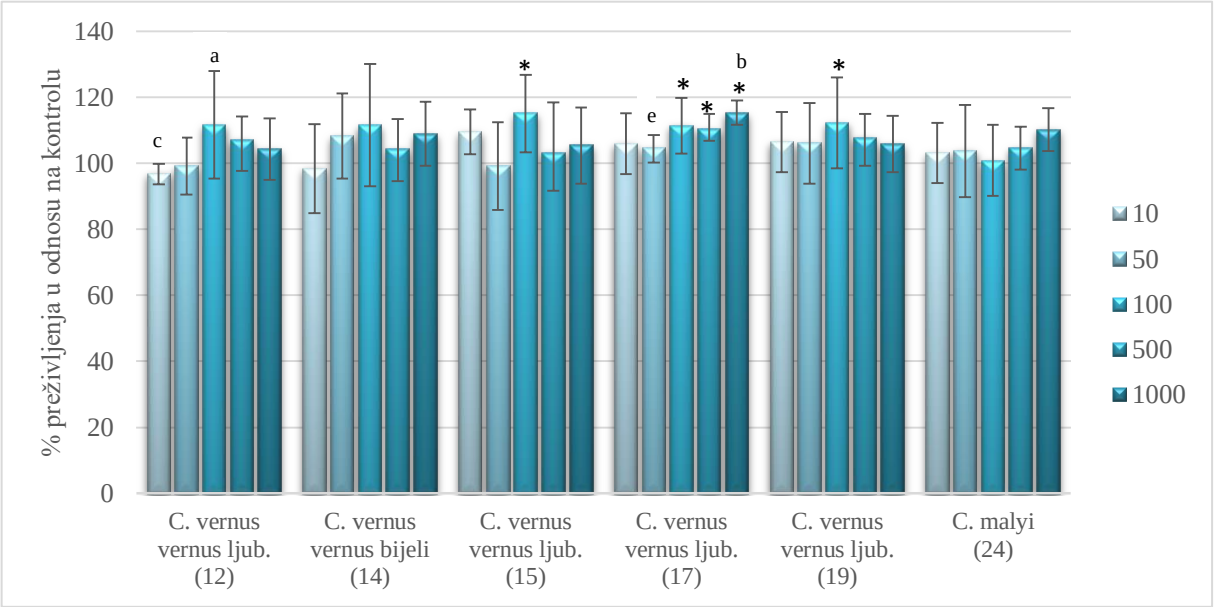
Tuberoso i suradnici (2016) su proučavali citotoksični učinak sokova dobivenih prešanjem bio-otpada proizvodnje začina šafrana na CaCo-2 stanične linije nakon inkubacije od 24 i 48 sati. Koncentracija ekstrakta je bila 0,1–50 μL mL^{-1}. Iako su koncentracije ekstrakta bile niske, uočen je citotoksični učinak (30% manje preživljenje u odnosu na kontrolu) nakon 48 sati već pri koncentraciji od 10 μL mL^{-1}. Nakon inkubacije od 24 sata preživljenje je bilo manje za 32% u odnosu na kontrolu, ali pri većoj koncentraciji od 50 μL mL^{-1}. Tretman ekstraktima 24 i 48 sati je puno dulji period nego što je bio tretman ekstraktima u ovom radu, odnosno 90 minuta. Također, u radu navedenih autora je nakon 48 sati primjećen pad preživljenja stanica za samo 30% u odnosu na kontrolu što i nije jako drastično smanjenje s obzirom na tako dug period inkubacije.



Slika 19. Citotoksični učinak (% u odnosu na kontrolu) uzoraka **4, 6, 9, 10** i **11**

10, 50, 100, 500, 1000 – koncentracije ekstrakata (µg mL^{-1})

* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$)



Slika 20. Citotoksični učinak (% u odnosu na kontrolu) **uzoraka 12, 14, 15, 17, 19** i **24**

10, 50, 100, 500, 1000 – koncentracije ekstrakata (µg mL^{-1})

* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$)

(a-e) - statistički značajna razlika u odnosu na konc. (µg mL^{-1}) a(10), b(50), c(100), d(500), e(1000),

Sánchez-Vioque i suradnici (2016) također su proučavali citotoksični efekt ekstrakata latica na CaCo-2 staničnim linijama. Autori su priredili ekstrakte latica u 0,5%-tnom etanolu. Rezultati su pokazali da je efektivna doza (E_{50}) inhibicije proliferacije bila 420 μg mL^{-1} nakon inkubacije od 4 dana. Prema njihovoj tvrdnji CaCo-2 stanice zadržavaju obilježja stanica raka sve dok im je spriječeno da formiraju kofluentni monosloj. CaCo-2 stanice ovog rada su uzgojene u kofluentnom monosloju pa je moguće da zbog toga nemaju ista svojstva kao stanična linija iz rada Sánchez-Vioque i suradnika, a i rada Tuberosa i suradnika (2016), koji također stanice nisu uzgajali u konfluentnom monosloju.

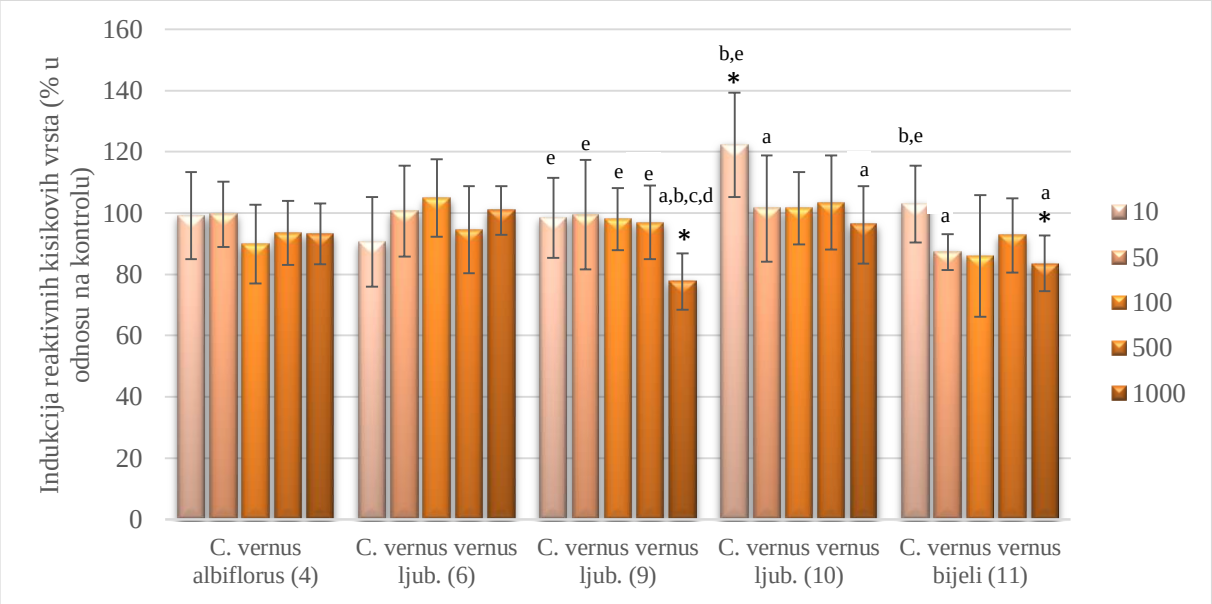
CaCo-2 stanične linije vrlo se često koriste u *in vitro* eksperimentima, kao model stanica raka, ali i za druge svrhe. Često su korištene i za proučavanje citotoksičnog učinka toksina i ksenobiotika koji pokazuju toksična djelovanja i na netumorskim stanicama te u *in vivo* uvjetima. *Fusarium* mikotoksini su djelovali toksično u nekoliko *in vivo* studija te se smatra da mogu negativno djelovati na zdravlje ljudi. Kouadio i suradnici (2005) su proučavali učinak tih mikotoksina na CaCo-2 staničnim linijama te su mjerili preživljenje stanica *Neutral red* metodom nakon 24-satne inkubacije. Mikotoksini su pokazali značajno smanjenje preživljenja CaCo-2 stanica. Prema tome, ako ekstrakti šafrana ovog rada nisu pokazali citotoksičan učinak na ove stanice, možda ne bi djelovali citotoksično ni u *in vivo* studijama i na netumorske stanice što bi moglo povećati sigurnost njihove potencijalne upotrebe u prehrambenoj industriji.

Ekstrakti bio-otpada proizvodnje šafrana (latice, prašnici i vratovi tučka) testirani su i na ne tumorskim stanicama fibroblasta (3T3). Autori su uspoređivali citotoksični učinak različitih ekstrakata pripremljenih s otapalima različitih polarnosti (voda, voda:HCl, etanol, etanol:HCl, diklorometan i heksan). Preživljenje stanica mjerili su MTT testom. Nakon tri dana inkubacije nije uočen značajan citotoksični efekt u koncentracijama ekstrakta do 900 μg mL^{-1}, osim kod etanolnog gdje je preživljenje palo za 38% u odnosu na kontrolu (Serrano-Díaz i sur., 2014). Rezultati navedenih autora su u skladu s rezultatima ovog rada jer ni vodeni ekstrakti analiziranih šafrana nisu bili citotoksični pri koncentracijama do 1000 μg mL^{-1}.

4.3.2. Indukcija reaktivnih kisikovih vrsta

Na slikama 21 i 22 prikazana je indukcija reaktivnih kisikovih vrsta u odnosu na kontrolu nakon tretmana ekstraktima latica šafrana 90 minuta.

Reaktivne kisikove vrste (eng. *reactive oxygen species*, ROS) nastaju tijekom normalnog metabolizma kisika u stanici ili kao odgovor na vanjske čimbenike (pušenje, zagađivači iz okoliša, radijacija, lijekovi, pesticidi, itd.) te u prevelikoj količini uzrokuju oksidativni stres koji je povezan s nastankom mnogobrojnih bolesti kao što su rak, kardiovaskularne bolesti i dijabetes. Stanica posjeduje mehanizme neutralizacije slobodnih radikala, enzimske sustave i endogene antioksidanse, međutim ti sustavi nekada nisu dovoljni te su organizmu potrebni i egzogeni antioksidansi (hrana, piće, dodaci prehrani) da bi se uspješnije borio protiv slobodnih radikala (Carocho i Ferreira, 2013).

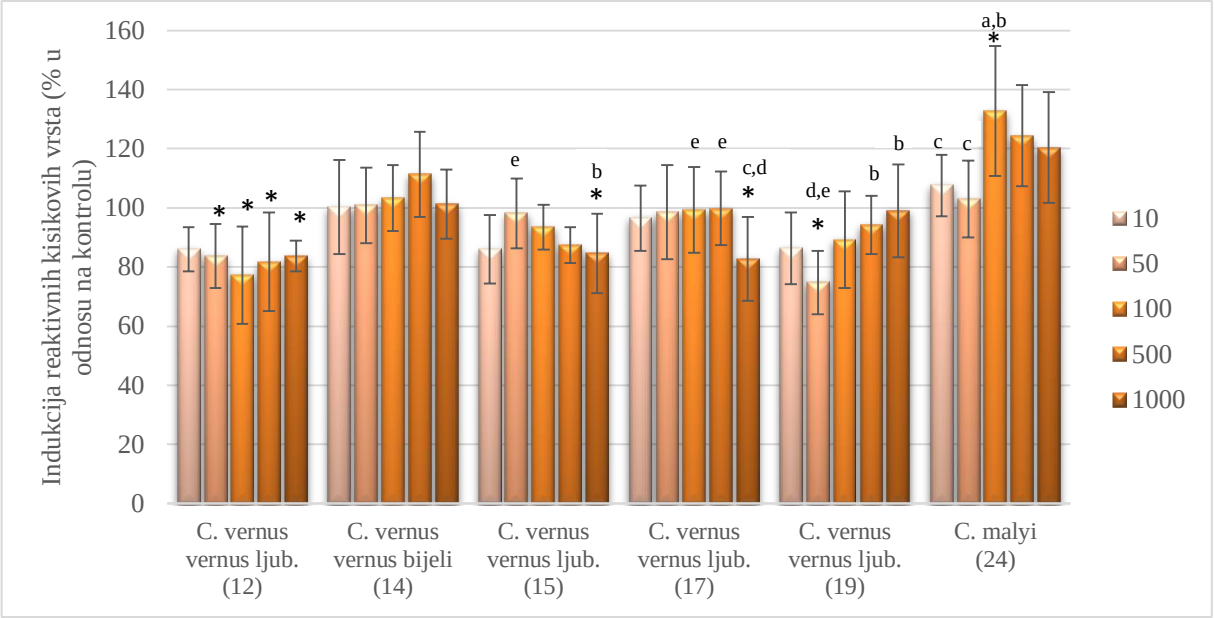


Slika 21. Indukcija reaktivnih kisikovih vrsta (% u odnosu na kontrolu) **uzoraka 4, 6, 9, 10** i **11**

10, 50, 100, 500, 1000 – koncentracije ekstrakata (μg mL^{-1})

* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$)

(a-e) - statistički značajna razlika u odnosu na konc.(μg mL^{-1}) a(10), b(50), c(100), d(500), e(1000), ($p<0,05$)



Slika 22. Indukcija reaktivnih kisikovih vrsta (% u odnosu na kontrolu) **uzoraka 12, 14, 15, 17, 19** i **24**

10, 50, 100, 500, 1000 – koncentracije ekstrakata (μg mL^{-1})

* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$)

(a-e) - statistički značajna razlika u odnosu na konc. (μg mL^{-1}) a(10), b(50), c(100), d(500), e(1000), ($p<0,05$)

Statistički značajno smanjenje indukcije ROS-a u odnosu na kontrolu uočeno je kod najveće koncentracije ekstrakata (1000 μg mL^{-1}) uzoraka **9, 11, 15** i **17**. Kod uzorka **12** sve ispitane koncentracije osim 10 μg mL^{-1}, su smanjile indukciju reaktivnih kisikovih vrsta u odnosu na kontrolu.

Što se tiče statistički značajne razlike među koncentracijama istog uzorka, najbolji se pokazao uzorak **9** gdje je najveća koncentracija statistički značajna u odnosu na sve ostale koncentracije, što znači da je došlo do značajnog smanjenja indukcije ROS-a.

Stanice raka već ionako imaju povišene razine ROS-a u odnosu na normalne stanice (Schumacker, 2006) pa bi ekstrakti uzoraka koji su ih snizili potencijalno još i bolje djelovali na normalnim stanicama ili u *in vivo* uvjetima.

Blago povišenje oksidativnog stresa, odnosno ROS-a u stanici može povisiti razine endogenih antioksidativnih sustava u stanici (Halliwell, 2008). Povećana indukcija ROS-a u manjim koncentracijama nakon koje slijedi smanjenje kod uzoraka **10** i **11** može se objasniti sinergističkim djelovanjem endogenih antioksidativnih sustava i bioaktivnih tvari ekstrakta šafrana koji onda zajedno snižavaju razinu ROS-a (Jacob, 1995).

Statistički značajno prooksidativno djelovanje (povišena indukcija ROS-a) u odnosu na kontrolu je pokazala koncentracija 10 μg mL^{-1} ekstrakta uzorka **10** te koncentracija 100 μg mL^{-1} uzorka **24**. Flavonoidi također mogu djelovati i prooksidativno što uvelike ovisi o uvjetima u kojima se nalaze, koncentraciji i ostalim prisutnim spojevima. Prisutnost kisika i metala bakra i željeza u istom sustavu s polifenolima može rezultirati povećanom produkcijom ROS-a i fenoksil radikala (Carocho i Ferreira, 2013).

4.3.3. Povezanost citotoksičnosti, indukcije reaktivnih kisikovih vrsta i koncentracije identificiranih glikozida i aglikona

Statistički značajna korelacija između citotoksičnosti i indukcije reaktivnih kisikovih vrsta uočena je samo u uzorku **11**. Korelacija je negativna, odnosno kada preživljenje stanica raste, indukcija reaktivnih kisikovih vrsta je u padu i obratno. Kada se stanice ubrzano razmnožavaju proizvode i velike količine slobodnih radikala pa je ova korelacija u suprotnosti s podacima iz literature za stanične linije raka (Sauer i sur., 2001).

Kod ostalih uzoraka nije pronađena povezanost citotoksičnosti i indukcije reaktivnih kisikovih vrsta. Značajan citotoksičan efekt nije uočen kod nijednog uzorka, a smanjenje i povećanje količine reaktivnih kisikovih vrsta je primjećeno kod određenih uzoraka i koncentracija pa se može zaključiti da indukcija reaktivnih kisikovih vrsta, bila smanjena ili povećana, nije utjecala na preživljenje stanica CaCo-2 stanične linije.

Latice ljubičaste forme *C. vernus* ssp. *vernus*, Botanički vrt, 2016.g. **(12)** čiji je ekstrakt jedini pokazao statistički značajno smanjenje reaktivnih kisikovih vrsta u svim ispitivanim koncentracijama osim najmanje (10 μg mL^{-1}) su ujedino i latice s najvećom masom kvercetina i kempferola određenih u hidroliziranim ekstraktima latica. Iako latice ljubičaste forme *C. vernus* ssp. *vernus* iz Park prirode Samoborsko gorje, 2014.g **(6)** sadrže veću količinu kempferol-3-*O*-rutinozida od latica uzorka **12**, njihov ekstrakt nije statistički značajno smanjio indukciju ROS. Takav rezultat još jednom ukazuje na važnost sinergističkog djelovanja svih spojeva u ekstraktu.

Latice *C. malyi* iz Nacionalnog park Sj. Velebit, 2015.g. **(24)** čiji je ekstrakt u koncentraciji od 100 μg mL^{-1} uzrokovao najviše značajno povišenje reaktivnih kisikovih vrsta u odnosu na kontrolu, jedini su predstavnik latica vrste *C. malyi*. Ekstrakt tih latica nije sadržavao kempferol-3-*O*-rutinozid, a u njemu je određena najveća količina kvercetin-3,4'-di-*O*-glukozida.

Veće količine tog glikozida pronađene su i u laticama **9, 15, 17** i **19** (sve ljubičaste forme podvrste *C. vernus* ssp. *vernus*), a ekstrakti svih navedenih latica su uzrokovali statistički značajno smanjenje reaktivnih kisikovih vrsta u jednoj od koncentracija.

Ovo istraživanje je doprinijelo poznavanju sadržaja flavonoida i biološkog učinka vodenih ekstrakata samoniklih šafrana hrvatske flore, a općenito i samoniklih šafrana o kojima postoji manjak znanstvene literature. Svojim bioaktivnim sastavom samonikli šafrani mogu konkurirati kultiviranoj vrsti *C. sativus* L., a nije ih potrebno kultivirati te su veoma rasprostranjeni po cijeloj Hrvatskoj.

5. ZAKLJUČCI

1. U svrhu ekstrakcije flavonoida iz liofiliziranih biljnih tkiva različitih svojti samoniklih šafrana najboljom od tri metode ekstrakcije se pokazala metoda ekstracije vodom zagrijanom na 80 °C, 30 minuta pri 80 °C bez upotrebe ultrazvučne kupelji.
2. Latice, prašnici i tučci bili su bogatiji identificiranim flavonoidima od lukovica i stabljika.
3. Bijela i ljubičasta forma podvrste *C. vernus* ssp. *vernus* iz Čazme, 2016. g. su najbogatije aglikonima kvercetinom i kempferolom.
4. Uočena je visoka korelacija između masa kvercetina i kempferola u laticama, odnosno kvercetina, kempferola i izoramnetina u prašnicima.
5. Od dijelova cvijeta, latice su dio najbogatiji kempferol-3-*O*-rutinozidom, a prašnici kvercetin-3-*O*-glukozidom.
6. Glikozid kempferol-3-*O*-rutinozid je specifičan za latice podvrste *Crocus vernus* ssp. *vernus*. U laticama *C. vernus* ssp. *albiflorus* i *C.malyi* nije detektiran.
7. Sadržaj analiziranih aglikona i glikozida flavonoida značajno varira ovisno o svojti i dijelu cvijeta.
8. Vodeni ekstrakti latica nisu pokazali citotoksično djelovanje na CaCo-2 staničnu liniju nakon tretmana od 90 minuta ni pri koncentraciji od 1000 $\mu g\ mL^{-1}$.
9. Ekstrakt ljubičaste forme podvrste *C. vernus* ssp. *vernus* iz Botaničkog vrta, 2016.g. je djelovao na statistički značajno sniženje indukcije reaktivnih kisikovih vrsta što se može pripisati njegovom bogatom bioaktivnom sastavu.
10. Ispitivani ekstrakti samoniklih šafrana hrvatske flore, posebice latice posjeduju dobar potencijal primjene u prehrambenoj industriji te se svojim biološkim učincima i sastavom analiziranih flavonoida mogu usporediti s kultiviranim šafranom *C. sativus* L.

6. LITERATURA

Acar, G., Dogan, N. M., Duru, M. E., Kıvrak, I. (2010) Phenolic profiles, antimicrobial and antioxidant activity of the various extracts of *Crocus* species in Anatolia. *Afr. J.Microbiol. Res.* **4**, 1154-1161.

Aguilar, M. I. (2004) Reversed-phase high-performance liquid chromatography. U: HPLC Peptides and Proteins, (Aguilar, M. I., ured.), Springer, New York, str. 9-22.

Aherne, S. A., O'Brien, N. M. (2002) Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, **18**, 75-81.

Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., Nebauer, S. G., Molina, R. V., i Gómez-Gómez, L. (2015) Saffron: its phytochemistry, developmental processes, and biotechnological prospects *J. Agric. Food Chem*. **63**, 8751-8764.

Akhondzadeh, B.A., Ghoreishi, S.A., Noorbala, A.A., Akhondzadeh, S.H., Rezazadeh, S.H. (2008) Petal and stigma of *Crocus sativus* L. in the treatment of depression: A pilot double-blind randomized trial. *J. Med. Plants Res.* **7**, 29–36.

Al-Snafi, A. E. (2016) The pharmacology of *Crocus sativus* - A review. *IOSR J. Pharm.* **6**, 8-38.

Antunes-Ricardo, M., Gutiérrez-Uribe, J. A., López-Pacheco, F., Alvarez, M. M., Serna-Saldivar, S. O. (2015) *In vivo* anti-inflammatory effects of isorhamnetin glycosides isolated from *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill cladodes. *Ind. Crops Prod*. **76**, 803-808.

Asai, K., Buurman, W. A., Reutelingsperger, C. P. M., Schutte, B., Kaminishi, M. (2003) Low concentrations of ethanol induce apoptosis in human intestinal cells. *Scand. J. Gastroenterol.* **38**, 1154-1161.

Asdaq, S. M. B., Inamdar, M. N. (2010) Potential of *Crocus sativus* (saffron) and its constituent, crocin, as hypolipidemic and antioxidant in rats. *Appl. Biochem. Biotechnol*. **162**, 358-372.

Bajerska, J., Mildner-Szkudlarz, S., Podgórski, T., Oszmatek-Pruszyńska, E. (2013) Saffron (*Crocus sativus* L.) powder as an ingredient of rye bread: an anti-diabetic evaluation. *J. Med. Food* **16**, 847-856.

Barreira, J., Oliveira, M. B. P. P., Ferreira, I. C., Martins, A., Costa, A. S., Santos-Buelga, C. (2014) Floral bio-residues of *Crocus sativus* L. as a potential source of anthocyanins. XX Encontro Luso-Galego de Química, Porto, str. 152.

Bell, L. N. (2007). Moisture effects on food's chemical stability. U: Water activity in foods. Fundamentals and applications (Barbosa-Cánovas, G.V., Fontana A.J., Schmidt S.J., Labuza T.P.,ured.), Blackweell Publishing Ltd, Ujedinjeno Kraljevstvo, str. 173-198.

Berger, A., Venturelli, S., Kallnischkies, M., Böcker, A., Busch, C., Weiland, T., Noor, S., Leischner, C., Weiss, T.S., Lauer., U.M., Bischoff, S. C., Bitzer, M. (2013) Kaempferol, a new nutrition-derived pan-inhibitor of human histone deacetylases. *J. Nutr. Biochem*. **24**, 977-985.

Boots, A. W., Haenen, G. R., Bast, A. (2008) Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur. J. Pharmacol.* **585**, 325-337.

Butsat, S., Siriamornpun, S. (2016) Effect of solvent types and extraction times on phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity in leaf extracts of *Amomum chinense* C. *Int. Food Res. J.* **23**, 180-187.

Calderón-Montaño, M., Burgos-Morón, J., Pérez-Guerrero, E., López-Lázaro, M. (2011) A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Rev. Med. Chem.***11**, 298-344.

Carmona, M., Sánchez, A. M., Ferreres, F., Zalacain, A., Tomás-Barberán, F., Alonso, G. L. (2007) Identification of the flavonoid fraction in saffron spice by LC/DAD/MS/MS: Comparative study of samples from different geographical origins. *Food Chem*. **100**, 445-450.

Carocho, M., Ferreira, I. C. (2013) A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol*. **51**, 15-25.

Cazarolli, L. H., Zanatta, L., Alberton, E. H., Figueiredo, M. S., Folador, P., Damazio, R. G., Pizzolatti, M.G., Silva, F.R. (2008) Flavonoids: prospective drug candidates. *Mini Rev. Med. Chem.* **8**, 1429-1440.

Chryssanthi, D. G., Lamari, F. N., Iatrou, G., Pylara, A., Karamanos, N. K., Cordopatis, P. (2007) Inhibition of breast cancer cell proliferation by style constituents of different Crocus species. *Anticancer Res.*, **27**, 357-362.

Cunningham, E. (2015) What nutritional contribution do edible flowers make? *J. Acad. Nutr. Diet.* **115**, 856.

D'Andrea, G. (2015) Quercetin: a flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia* **106**, 256-271.

Duan, J., Xie, Y., Luo, H., Li, G., Wu, T., Zhang, T. (2014) Transport characteristics of isorhamnetin across intestinal Caco-2 cell monolayers and the effects of transporters on it. *Food Chem. Toxicol*. **66**, 313-320.

Duijnhoven, F.J., Bueno-de Mesquita, H.B., Ferrari, P., Jenab, M., Boshuizen, H.C., Ros, M.M., Casagrande, C., Tjønneland, A., Olsen, A., Overvad, K. i suradnici (2009) Fruit, vegetables, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **89**, 1441–1452.

DuPont, M. S., Day, A. J., Bennett, R. N., Mellon, F. A., Kroon, P. A. (2004) Absorption of kaempferol from endive, a source of kaempferol-3-glucuronide, in humans. *Eur. J. Clin. Nutr.* **58**, 947-954.

Eppendorf Inc. (2017) službena stranica tvrtke Eppendorf, <https://www.eppendorf.com/OC-en>. Pristupljeno 15.6.2017.

Erlund, I. (2004) Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr. Res.* **24**, 851-874.

Feizy, J., Reyhani, N. (2016) Gas chromatographic determination of phytosterols and fatty acids profile in saffron petals. *Can. Chem. Trans.* **4**, 389-397.

Freshney, R. I. (2000) Quantitation-cell counting. U: Culture of animal cells (Wiley, J., Freshney, R. I., ured.), John Wiley and Sons, New York, str. 65-143.

Goli, S. A. H., Mokhtari, F., Rahimmalek, M. (2012) Phenolic compounds and antioxidant activity from saffron (*Crocus sativus* L.) petal. *J. Agr. Sci.* **4**, 175.

Goupy, P., Vian, M. A., Chemat, F., Caris-Veyrat, C. (2013) Identification and quantification of flavonols, anthocyanins and lutein diesters in tepals of *Crocus sativus* by ultra performance liquid chromatography coupled to diode array and ion trap mass spectrometry detections. *Ind. Crops Prod.* **44**, 496-510.

Gutiérrez-del-Río, I., Villar, C.J., Lombó, F. (2016) Therapeutic uses of kaempferol: anticancer and antiinflammatory activity. U: Biosynthesis, Food Sources and therapeutic uses, 1. izd., (Garde-Cerdán, T., Gonzalo-Diago A.,ured.) Nova Science Publishers, Inc., str. 71-100.

Habtemariam, S. (2011) A-glucosidase inhibitory activity of kaempferol-3-*O*-rutinoside. *Nat. Prod. Commun.* **6**, 201-203.

Halliwell, B. (2008) Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch. Biochem. Biophys.* **476**, 107-112.

Jacob, R. A. (1995) The integrated antioxidant system. *Nutr. Res.* **15**, 755-766.

Jacobson, A., L. (2017) Arthur Lee Jacobson - Plant of the Month, <http://www.arthurleej.com/> Pristupljeno 14.5.2017.

Kakouri, E., Daferera, D., Paramithiotis, S., Astraka, K., Drosinos, E. H., Polissiou, M. G. (2017) *Crocus sativus* L. tepals: The natural source of antioxidant and antimicrobial factors. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* **4**, 66-74.

Kiumarsi, A., Parvinzadeh Gashti, M., Salehi, P. Dayeni, M. (2017) Extraction of dyes from Delphinium Zalil flowers and dyeing silk yarns. *J. Tex. I.* **108**, 66-70.

Kouadio, J. H., Mobio, T. A., Baudrimont, I., Moukha, S., Dano, S. D., Creppy, E. E. (2005) Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology* **213**, 56-65.

Koulakiotis, N. S. (2015) Development of analytical methodology based on chromatographic and mass spectrometric techniques for the characterization and fingerprinting of bioactive compounds of *Crocus sativus* L. Doktorska disertacija, Sveučilište u Patrasu.

Kumar, S., Pandey, A. K. (2013) Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Sci. World J*. **2013**, 1-16.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr*. **79**, 727-747.

Melnyk, J. P., Wang, S., Marcone, M. F. (2010) Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. *Food Res. Int.* **43**, 1981-1989.

Milović, M. (2016) Rod *Crocus* L. (Iridaceae) u flori Hrvatske. *Glas. Hrvat. bot. druš.* **4**, 4-20.

Mitić, B., Mihelj, D., Hruševar, D. (2014) The genus *Crocus* L.(*Iridaceae*) in Croatia. In Food and Agriculture COST action FA1101 SaffronOmics 2014, Wageningen, str. 41-41.

Moratalla-López, N., Lorenzo, C., Alonso, G. L., Sánchez A.M. (2016) Kaempferol glycosides in *Crocus*: Sources, biosynthesis, and uses. U: Biosynthesis, food sources and therapeutic uses, (Garde-Cerdán, T., Gonzalo-Diago A.,ured.) Nova Science Publishers, Inc., New York, str. 151-196.

Nabavi, S. F., Russo, G. L., Daglia, M., Nabavi, S. M. (2015) Role of quercetin as an alternative for obesity treatment: you are what you eat. *Food Chem.* **179**, 305-310.

Nørbæk, R., Brandt, K., Nielsen, J. K., Ørgaard, M., Jacobsen, N. (2002) Flower pigment composition of *Crocus* species and cultivars used for a chemotaxonomic investigation. *Biochem. Syst. Ecol.* **30**, 763-791.

Phenol Explorer (2017), Database on polyphenol content in food, Food composition; <http://phenolexplorer.eu/contents/polyphenol/330> . Pristupljeno 2.6.2017.

Repetto, G., Del Peso, A., Zurita, J. L. (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc*. **3**, 1125-1131.

Righi, V., Parenti, F., Tugnoli, V., Schenetti, L., Mucci, A. (2015) *Crocus sativus* petals: waste or valuable resource? The answer of high-resolution and High-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 8439-8444.

Rop, O., Mlcek, J., Jurikova, T., Neugebauerova, J., Vabkova, J. (2012) Edible flowers—a new promising source of mineral elements in human nutrition. *Molecules*, **17**, 6672-6683.

Sánchez-Vioque, R., Santana-Méridas, O., Polissiou, M., Vioque, J., Astraka, K., Alaiz, M., Peñalver, D. H., Tarantilis, P. A., Girón-Calle, J. (2016) Polyphenol composition and in vitro antiproliferative effect of corm, tepal and leaf from *Crocus sativus* L. on human colon adenocarcinoma cells (Caco-2). *J. Funct. Foods* **24**, 18-25.

Sauer, H., Wartenberg, M., & Hescheler, J. (2001) Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell. Physiol. Biochem*. **11**, 173-186.

Schumacker, P. T. (2006) Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer cell* **10**, 175-176.

Schunko, C., Vogl, C. R. (2010) Organic farmers use of wild food plants and fungi in a hilly area in Styria (Austria). *J Ethnobiol. Ethnomed.* **6**, 17.

Serrano-Díaz, J., Sánchez, A. M., Martínez-Tomé, M., Winterhalter, P., Alonso, G. L. (2013) A contribution to nutritional studies on Crocus sativus flowers and their value as food. *J. Food Compost. Anal.* **31**, 101-108.

Serrano-Díaz, J., Estevan, C., Sogorb, M. Á., Carmona, M., Alonso, G. L., Vilanova, E. (2014) Cytotoxic effect against 3T3 fibroblasts cells of saffron floral bio-residues extracts. *Food Chem*. **147**, 55-59.

Shahi, T., Assadpour, E., Jafari, S. M. (2016) Main chemical compounds and pharmacological activities of stigmas and tepals of 'red gold'; saffron. Trends *Food Sci. Technol*. **58**, 69-78.

Termentzi, A., Kokkalou, E. (2008) LC-DAD-MS (ESI+) analysis and antioxidant capacity of *Crocus sativus* petal extracts. *Planta Med*. **74**, 573-581.

Tuberoso, C. I., Rosa, A., Montoro, P., Fenu, M. A., Pizza, C. (2016) Antioxidant activity, cytotoxic activity and metabolic profiling of juices obtained from saffron (*Crocus sativus* L.) floral by-products. *Food Chem*. **199**, 18-27.

Vellosa, J. C. R., Regasini, L. O., Khalil, N. M., Bolzani, V. D. S., Khalil, O. A., Manente, F. A., Netto, P. H., de Faria Oliveira, O. M. M. (2011) Antioxidant and cytotoxic studies for kaempferol, quercetin and isoquercitrin. *Eclét. Quim.* **36**, 7-20.

Verjee, S., Garo, E., Pelaez, S., Fertig, O., Hamburger, M., Butterweck, V. (2017) Saffron Flower Extract Promotes Scratch Wound Closure of Keratinocytes and Enhances VEGF Production. *Planta Med*. [online], doi: 10.1055/s-0043-109002.

Vignolini, P., Heimler, D., Pinelli, P., Ieri, F., Sciullo, A., Romani, A. (2008) Characterization of by-products of saffron (*Crocus sativus* L.) production. *Nat. Prod. Commun*. **3**, 1959-1962.

von Gadow, A., Joubert, E., Hansmann, C. F. (1997) Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α-tocopherol, BHT, and BHA. *J. Agric. Food Chem*. **45**, 632-638.

Wang, Y., Tang, C., Zhang, H. (2015) Hepatoprotective effects of kaempferol 3-O-rutinoside and kaempferol 3-*O*-glucoside from *Carthamus tinctorius* L. on CCl 4-induced oxidative liver injury in mice. *J. Food Drug. Anal.* **23**, 310-317.

Winterhalter, P., Straubinger, M. (2000) Saffron—renewed interest in an ancient spice. *Food Rev. Int.* **16**, 39-59.

Yang, H. W., Hwang, K. J., Kwon, H. C., Kim, H. S., Choi, K.W., Oh, K. S. (1998) Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum. Reprod.* **13**, 998-1002.

Zeka, K., Arro, R. (2016) Saffron Crocus (*Crocus sativus* L.) as a source of kaempferol. U: Biosynthesis, food sources and therapeutic uses, (Garde-Cerdán, T., Gonzalo-Diago A.,ured.) Nova Science Publishers, Inc., New York, str.197-216.

Zeka, K., Ruparelia, K. C., Continenza, M. A., Stagos, D., Vegliò, F., Arroo, R. R. (2015) Petals of *Crocus sativus* L. as a potential source of the antioxidants crocin and kaempferol. *Fitoterapia* **107**, 128-134.

Zuo, A., Yanying, Y., Li, J., Binbin, X., Xiongying, Y., Yan, Q., Shuwen, C. (2011) Study on the relation of structure and antioxidant activity of isorhamnetin, quercetin, phloretin, silybin and phloretin isonicotinyl hydrazone. *Free Rad. Antiox.* **1**, 39-47.